



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Disseny i aplicació d'eines quimiomètriques per a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals

Sara Piqueras Solsona

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de doctorat:
QUÍMICA ANALÍTICA DEL MEDI AMBIENT

DISSENY I APLICACIÓ D'EINES QUIMIOMÈTRIQUES PER A L'ANÀLISI D'IMATGES HIPERESPECTRALS

Memòria presentada per Sara Piqueras Solsona per a optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Directors

Dra. Anna de Juan Capdevila

Professora titular del Departament de
Química Analítica. Universitat de Barcelona.

Dr. Romà Tauler Ferré

Professor d'Investigació del Departament de
Química Ambiental de l'Institut de Diagnòstic
Ambiental i Estudis de l'Aigua. CSIC.

Als meus Pares i a l'Alex,

"Una imatge val més que mil paraules"

AGRAÏMENTS

“Les coses simples haurien de ser simples, i les coses complexes haurien de ser possibles” i aquesta tesi ha estat possible gràcies a tots vosaltres per això us ho agraeixo de tot cor i amb aquestes paraules.

Primer de tot, aquesta tesi ha estat possible gràcies a tu, Anna de Juan, una directora *Cum laude*. Em vas donar l'oportunitat de seguir coneixent i investigant sense jutjar el que sabia o deixava de saber, vas confiar amb mi, i em vas ensenyar tot el que saps. Comparteixes la teva saviesa amb els demés, sense demanar res a canvi, i entre rialles i positivisme. Ets una persona increïble, i per això i moltes coses més, la gent t'estima i t'admira tant. Gràcies perquè he tingut molta, però molta sort, que hagi estat la meva directora. Gràcies per fer-me aquest camí tan fàcil i tan bonic, mai ho oblidaré. He intentat fer aquesta tesi el millor possible, espero que estiguis contenta. Sempre t'ho agrairé. Et trobaré molt a faltar.

També donar les gràcies al meu director Romà Tauler. Gràcies per confiar en que jo era una bona candidata per a fer aquesta feina. M'has donat dues de les coses que més m'agraden: aprendre i viatjar. Sé que ens hauríem d'haver vist una miqueta més, però tot i així, gràcies per revisar cadascun dels meus treballs, i per donar la mateixa oportunitat a gent estrangera que he tingut el plaer de conèixer. Tinc bon record de compartir més d'una rialla als congressos. Gràcies, de debò.

Els meus directors de tesi són tot un luxe, però com que sóc una *suertuda* també he tingut uns companys de laboratori que són *la canya*. La meva germaneta, la meva *wapeta*, encara recordo el primer dia que et vaig veure, no sabia d'on venies. Després, per circumstàncies de la vida, vas resultar ser la meva companya, la meva amiga i la meva germana entre els passadissos del Departament de Química Analítica. Silvieta, tinc tants bons records durant aquests anys de tesi, tants bons moments (Bèlgica, Roma, New York, piset gràcia, sopar de Nadal a la facultat, la Corunya...) ... També n'hem tingut algun de dolent, però els cafès del matí servien per solucionar-los, i també el *gym*. T'he trobat molt a faltar durant aquest últim any. Sempre t'agrairé la confiança, ànims, i suport que m'has donat. Ara entenc que feies en aquell laboratori el primer dia que et vaig veure. També comparteixes el teu saber i ajudes al màxim als demés, igual que l'Anna. Vals molt germaneta, creu-me que aconseguiràs tot el que et proposis. Gràcies per la teva ajuda gratuïta. Gràcies al *Pedomani* per compartir els seus moments de màster amb mi, pels seus massatges, cultura musical, i els seus dolors corporals diaris. Gràcies per ser tan autèntic.

AGRAÏMENTS

És una pena quan la gent marxa del laboratori, però la part bona es que sempre hi ha gent nova que entra. Donar les gràcies al Victor per haver entrat i compartir amb mi el passadís dels ordinadors durant aquests dos últims anys. No sabia que algú podia parlar més que jo. Gràcies per aguantar els meus moments d'histèria (tan laborals com personals) i sempre escoltar-me i ajudar-me. M'ha agradat molt compartir la recerca de girar les imatges amb tu. Gràcies per la teva solidaritat i personalitat (que m'ha sorprès molt positivament), perquè som dos persones molt diferents, però hem arribat a tenir molta confiança. I a la Laurita, l'últim fitxatge del passadís, gràcies per aguantar el meu silenci i concentració de la recta final, me n'alegro molt que un altre nervi es quedi al laboratori fent companyia al Victor.

No m'oblido de l'altra ala del laboratori: Sanae, gràcies per la teva senzillesa, humilitat i el teu somriure que et caracteritza. Raimundo, gràcies pels teus *Gutten Morgen*, pel teu sentit del humor, i per l'excel·lent en les pràctiques de Química Analítica. A tu també *Teixi*, que estaves mig connectat amb aquesta sala i que ets *l'alegria de l'hort*, et trobem a faltar.

Aquestes dues sales del laboratori de Quimiometria i Equilibris en Solució, han estat de trànsit per a molta gent d'un món molt divers: Brasil, Itàlia, Polònia, França, Letònia, Índia, China, Austràlia... a tots vosaltres, gràcies per enriquir-me amb la vostra cultura, i pel intercanvi de coneixements. Haig d'agrair especialment l'ajuda del Dr. James Burger, que des de Letònia va portar al nostre laboratori el primer NIR imaging al estil IKEA. I l'estada del professor Marcel Maeder, que la seva taula s'assemblava més a una consulta de dubtes científics, i ell sempre estava predisposat a solucionar-los.

Tampoc m'oblido de la nostra mitja taronja, el grup del CSIC. La vostra aportació ha estat clau perquè projectes com el meu, i els nous que han vingut, surtin endavant i ofereixin la oportunitat a les noves generacions. La col·laboració és la clau de l'èxit. Gràcies al Joaquim Jaumot, crec que ets un dels pilars d'aquest grup; al Stefan per la seva autenticitat i serenitat; al Xin per la seva dedicació; i a la Mireia per la seva valentia i pels *cosmopolitans*, vinets i sobretot riures compartits arreu del món. A tota la *trupe* de doctorants: molta sort i ànims.

No he parat quieta durant aquests anys, i he de donar les gràcies al grup Lasir de la Université des Sciences et Technologies de Lille 1, per donar-me la oportunitat de treballar amb tots ells; especialment al Dr. Ludovic Duponchel, per ser un bon amfitrió i company de feina, i a en Marc Offroy, per la seva ajuda (moltes vegades mitjançant gestos) i per als dinars amb tots el seus

AGRAÏMENTS

amics que semblaven sortits de la NBA. També agrair la meua estada a en Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT, Jena), una experiència inoblidable plena d'aventures, reptes, treball i cultura. Valoro l'ajuda de la Claudia Beleites, que dintre de les seves infinites tasques investigadores, treu un forat per socorre't dels dubtes espectroscòpics, microscòpics i informàtics; i del Dr. Christoph Krafft, per deixar-me via lliure per fer i desfer. Fora del món científic, agrair a l'associació Iberoamerica de Jena, per acollir-me com una família. Particularment a la Teresa i a la Carol, que em van donar tots els seus cinc sentits. També donar gràcies a *mi peliroja* Mary que "Dresden te conecí Praga que te voy a olvidar", i a la Maria, per les xerrades i el tiquets per a les classes de Zumba. Tots vosaltres vau fer de la meua estància, una de les experiències més boniques de la meua vida. Danke schön.

Retrocedint des de l'inici d'aquest treball, gràcies a tots els meus companys d'universitat, per les hores que vam passar a la biblioteca (inclosa la nocturna), per les tardes als laboratoris, per les barbacoes, les *quimifarres*... Però en especial a la meua doctora Coral Herranz, gràcies per la teua saviesa, consells, i per confiar plenament amb mi. En part tu em vas obrir aquest camí (si no sabia ni que era un alumne intern). Increïble la teua trajectòria. Les teves ganes de superar-te fa que tot allò que et proposes ho compleixis, fins i tot els teus somnis. Ets la meua aigua, foc, terra i aire junt amb la Silvia, qui també comparteix aquesta passió per a la investigació. Gràcies Silvia (*paivon*) per estar allà sempre que te necessitat, sempre he rebut pau i amor del teu grandíssim cor. Espero de tot cor que les coses et vagin molt bé a Texas.

Durant aquest llarg camí, hi ha persones que han caminat amb mi agafades de la mà des de que érem molt petites. Aquestes són les meves *Teresianites* Miriam, Rita, i Gemma, que des dels tres anys portem juntes, i viscudes moltes experiències. I les que queden per endavant! Gràcies Miriam pel teu toc de bogeria que sempre m'ha fet desconnectar de moments que em pensava que no hi havia sortida. Tens màgia, sempre m'has donat força, i encara que no tu creguis, he entès com ets, i això ha fet que la nostra amistat creixi, i que encara pugui créixer més. Et regaré cada dia. Gràcies Rita per la teua empatia durant el moment de la tesi, i per la teua sinceritat. Crec que el teu esforç de superació durant aquests anys sempre m'ha motivat, estic molt contenta que t'hagis acabat superant a tu mateixa, i que estiguis tan guapa i radiant com ara. I la meua Gemma, mi *vecina dormilona*, quantes vegades t'he esperat sota el portal? Ara espero que siguis molt feliç amb tot el que has aconseguit. Gràcies per els teus ànims *guerreros*, ets una

AGRAÏMENTS

lluitadora nata. Gràcies perquè sempre has lluitat pel meu benestar i la meva amistat. Us estimo molt, i mai deixaré que us allunyeu del meu camí: ens podem desviar, però mai separar.

Un altre persona per mi molt especial, que diria que fins i tot abans de tenir consciència hem estat carn i ungla és la meva Laieta. Gràcies per aguantar les meves ordres des de que érem petites, per jugar amb mi hores infinites, per escoltar les meves lliçons i presentacions de congressos, per saber que la meva tesi és sobre alguna cosa súper *friki* “Hyperspectral images”. Gràcies per estar sempre al meu costat, mai m’has fallat.

Gràcies al xat “amores”. Gràcies a totes per acceptar-me dins del grup sense entendre molt bé el que faig. *Merci* Gomet per escoltar-me en molts moments, realment m’ha sorprès molt la teva amistat, moltes gràcies de veritat. Confio molt en tu, i se que aconseguiràs tot allò que et proposis. Gràcies Annita Dinamita pel teu positivisme i alegria que contagies a tothom. Marita, gràcies per la teva encantadora bogeria. I per últim, gràcies a la meva *gamel* que ha compartit des de ven a prop el que és una tesi, crec que està preparada per fer-ne una i tot. Gràcies per la teva ajuda i per facilitar-me el camí en moments difícils. Gràcies per coneixem més enllà i acceptar-me. Gràcies per a la teva disposició i per la teva felicitat per a les petites coses. No tinguis por, hi ha moments difícils a la vida, però sempre hi han petites coses que et podran fer feliç. *Moles més que la coke*.

Gràcies a la meva família *How I meet your mother*, els vostres xats m’han fet riure en moments que l’ordenador em feia un *out of memory*. Sergio i Guille, gràcies per les vostres ironies i moments de riure. Silvieta, gràcies per preguntar que és una tesi i la teva disposició d’ajuda incondicional a les persones. Rutxi, *merci* per estimar el que estimo. I a la meva mona Mons, que per mi ja ets de la família; primer de tot, gràcies per ajudar-me a fer aquesta portada tan *chula*, i gràcies per la teva atenció i la teva compatibilitat. Gràcies al meu monito Antonio, amic fidel i indispensable, que tot i estar lluny aquests últims anys, ha estat a peu de canyó, i sempre té un consell, trucada o paraula que dir-te.

Gràcies a les meves *party girls*. Gràcies per aquestes birretes d’última hora, per poder quedar a partir de les 21. Gràcies Aida, Rata i Gina, pels consells, i per fer d’un problema una rialla. Gràcies a les meves *paivons*, Silvia i Pichon, per aguantar més d’una tesi, i no saber ni de què estàvem parlant. Gràcies a la Miru pels balls que hem compartit els dilluns i dimecres als vespres. Gràcies

AGRAÏMENTS

per escoltar-me durant els viatges de tramvia i sobretot gràcies per compartir amb mi la teva amistat. Gràcies a totes per estar amb mi incondicionalment.

Haig de donar les gràcies a la única persona que de debò ha patit gran part de la tesis (ja que ell també està fent una). Ell ha patit els meus nervis incontrolables, les meves queixes, i el dit al ull a mitja nit perquè neguitosa no podia dormir. Àlex, tot va començar amb un *follow the sun*, i si miro cap enrere... ostres Alexito! Hem crescut d'una manera junts i ho hem aconseguit, gràcies per confiar en mi. Donar-te les gràcies se'm queda curt. M'has aportat calma i positivisme en tot moment, no has deixat mai de pensar en mi abans que en tu, la teva ajuda incondicional ha fet que escriure aquesta tesi hagi estat un camí fàcil i agradable. Hores d'estiu asseguts a la taula de Masnou, els nostres petits premis per estar 8 hores escrivint, les migdiades de 10 min... Ara hem de dibuixar un nou camí, no serà senzill ni planer, però som persones que ens agraden els reptes, i junts i amb el nostre carisma, l'arribarem a viure. Gràcies per ensenyar-me a estimar amb consciència, bondat, passió i bogeria. Sempre em fas la persona més feliç. Felicitats doctor en filosofia Frias. Uns *bailes* de celebració no?

Per últim donar les gràcies a la meva família. Pels seus pensaments, educació, consells, ensenyança, objectivitat... M'ho heu donat tot, mai m'ha faltat de res. Tot aquest treball es gràcies a vosaltres. Gràcies sobretot al meus pares, que crec que han suat més que jo aquests anys de tesi. Per mi sou els millors pares del planeta, sé que sona típic, però es que ho sento així. Sou diferents, però us complementeu tan bé que això transmet felicitat i benestar als demés. Gràcies *papi* per sempre resoldrem els dubtes, per les teves pagues generoses, per fer més senzilles les coses i no complicar-les més del que no calien, pels teus riures i plors fàcils. Gràcies per treballar sempre per donar-nos el millor, pels teus petons de cada matí. Gràcies per estimar tant a la *polvorilla*. Gràcies mama, no se que faria sense tu, ets la persona que millor em coneixes, i la que millors consells m'ha donat i em donarà sempre. Gràcies per ser com ets, ets la persona més bona que he conegut mai, t'admiro com a mare i com a persona. Gràcies per entendre, ets la única que entén el nervi i patiment que portem a dins, qui entén aquell dolor de cames millor que nosaltres eh? Ho has fet tot perfecte, de debò. Ara et toca gaudir-ho. Gràcies per ser tan valenta, generosa i forta per tornar a ser mare. M'has donat la vida i jo te la faré lo més feliç que pugui. Gràcies a la meva àvia Ramona, que ja no esta amb nosaltres, gràcies per quan m'escoltaves les lliçons mentre em feies un si amb el cap. M'agradaria que estiguessis per dir-me: no entenc com pots estudiar tant! Però se que allà on ets, estàs molt bé. Gràcies a la

AGRAÏMENTS

meva *sister* per compartir la vida amb mi, per defensar-me i cobrir-me les esquenes en alguna ocasió. Gràcies per la teu *desparpajo* natural i per ser tan bona i donar-m'ho tot sense que et costi res. M'alegro que estiguis tan feliç. Olga presidenta! Gràcies Jordi i a la *terremoto* de l'Arán, heu arribat en el moment oportú. Gràcies per la nova brisa de felicitat a la família. Gràcies al meu tiet Joan i a la meva tieta Amparo, que sempre estan allà ajudant i donant suport. Gràcies als meus cosins Mireia i Oscar per aguantar al *bicharrejo* nerviós. Gràcies també als meus cosins Nuria i Javi, i a la nova Pauleta per les tardes de xerrera a la Plaça Molina. Gràcies per entendre la meva absència durant aquests últims mesos. També donar les gràcies a la meva altra nova família, als meus sogres i els meus cunyats. Gràcies Jose per donar-me més que un entrepà. Gràcies Carme per les teves trucades i ajuda. Gràcies Sergi per no tenir *whatsapp* i per la teva passió que encomana a tothom. I gràcies a la Sareta per ser tan mona i agradable.

"So follow, follow the sun. The direction of the birds, The direction of love, Breathe, breathe in the air, Cherish this moment, Cherish this breath, Tomorrow's a new day day for everyone. A brand new moon, brand new sun"

RESUMS

Les imatges hiperespectrals són una mesura instrumental singular i de gran interès, ja que proporcionen informació química (espectral) i de distribució espacial (imatge) dels constituents de les mostres. Aquest fet les fa especialment interessants en aplicacions de la indústria farmacèutica, dels camps mediambiental i biomèdic i en la recerca i identificació de materials.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat el coneixement de la naturalesa de la mesura de les imatges hiperespectrals amb la finalitat de dissenyar o adaptar eines d'anàlisi de dades més específiques i de proporcionar protocols d'actuació per a la interpretació d'aquest tipus de mesura en funció del tipus de tècnica espectroscòpica utilitzada i del problema químic d'interès.

De manera específica, aquest treball s'ha centrat en l'estudi del potencial del mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats, MCR-ALS, per a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals, que proporciona mapes de distribució i espectres purs dels constituents de les imatges a partir únicament del coneixement de la mesura original. S'ha treballat amb l'anàlisi d'imatges individuals i l'anàlisi conjunta d'imatges obtingudes amb la mateixa tècnica o amb diferents plataformes espectroscòpiques.

A partir de l'estudi d'imatges Raman i IR associades a problemes químics de diferents tipologies, s'han proposat protocols d'anàlisi que inclouen el preprocessat de les dades originals, l'obtenció dels mapes de distribució i espectres purs dels constituents de la imatge i el postprocessat dels mapes i espectres resolts per a l'obtenció d'informació addicional. L'ús dels mapes i espectres resolts proporciona informació molt diversa, com és ara la identificació, la quantificació i la caracterització de l'heterogeneïtat dels constituents de la imatge o la interpretació global i local d'un procés. Els mapes resolts han estat també una informació de partida excel·lent en altres tipus d'anàlisi, com la segmentació de la imatge o en procediments de superresolució, orientats a millorar la resolució espacial de les imatges instrumentals.

La combinació de l'anàlisi multiconjunt de resolució i segmentació s'ha revelat de gran utilitat per a distingir poblacions de mostres de teixits biològics amb diferents estats patològics. Per últim, s'ha proposat un procediment per a la fusió i anàlisi d'imatges adquirides amb diferents tècniques espectroscòpiques i de diferent resolució espacial mitjançant una nova variant del mètode MCR-ALS per a estructures multiconjunt incompletes, que permet aprofitar la informació complementària de les tècniques acoblades i preservar la màxima resolució espacial.

Hyperspectral images are unique instrumental measurements that contain chemical (spectral) information and detailed knowledge of the distribution of the sample constituents on the sample surface scanned. These characteristics make images particularly relevant in application areas, such as pharmaceutical industry, environmental analysis, biomedical diagnostic and materials science.

This thesis is mainly oriented to know in depth the nature of this instrumental measurement in order to design and adapt specific chemometric tools that help in the proposal of general protocols for the interpretation of hyperspectral images according to the spectroscopic technique used and the chemical problem of interest.

Particularly, much work has been focused on the study of the potential of multivariate curve resolution-alternating least squares, MCR-ALS, for the analysis of hyperspectral images. This algorithm provides distribution maps and pure spectra for the image constituents from the sole information contained in the raw measurement. Within this framework, individual analysis of images and image multiset analysis on data structures formed by images collected with the same technique or by images coming from different spectroscopic platforms have been explored.

From the study of Raman and IR hyperspectral images linked to different chemical problem typologies, data analysis protocols have been proposed that include preprocessing of original data, recovery of distribution maps and pure spectra of image constituents and postprocessing of resolved maps and pure spectra to obtain further information. Resolved distribution maps and pure spectra provide diverse information, such as identification, quantification and heterogeneity characterization of the image constituents or the global and local description of a process. The use of resolved distribution maps has proven to be an excellent starting point for other kinds of analysis, such as image segmentation or super-resolution algorithms, oriented to improve the spatial resolution of experimental hyperspectral images.

Combined multiset resolution and segmentation analysis has been shown to be very useful for the differentiation of populations of biological tissues with different pathological conditions. Finally, a strategy for data fusion of hyperspectral images from different spectroscopic platforms and different spatial resolution has been proposed. This approach uses a new variant of MCR-ALS for incomplete multiset structures that takes advantage of the complementary information provided by the different spectroscopic techniques without losing spatial resolution.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AOTF	Filtre sintonitzable optoacústic
APD	Fotodíodes d'allau
API	Principi actiu
AsLS	Mínims quadrats asimètrics
ATR	Reflexió total atenuada
CCD	Dispositiu de càrrega acoblada
\overline{C}_{ALS}	Valors mitjans dels perfils de concentració
DESI	Ionització per desorció amb electroesprai
DR	Reflexió difusa
EMCDD	Dispositius multiplicadors d'electrons de càrrega acoblada
EMSC	Extensió de la correcció multiplicativa de la dispersió
FDA	Administració de medicaments i aliments
FIR	Infraroig llunyà
FPA	Detector de pla focal
FSIW-EFA	Anàlisi de factors emergents amb finestra d'imatge de mida fixa
FSMW-EFA	Anàlisi de factors emergents amb finestra mòbil de mida de píxel
FTIR	Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier
LCF	Filtre de cristall líquid sintonizable
LD	Làser de díode
LEDs	Díodes d'emissió de llum
LIDAR	Detecció per imatges amb làser i mesura de la distància
LOF	Manca d'ajust
MALDI	Desorció/ionització assistida per matriu mitjançant làser
MCR-ALS	Resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats
MCT	Detector de mercuri, cadmi i tel·luri

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

MIA	Anàlisi multivariant de la imatge
MIR	Infraroig mitjà
MIR	Regressió multivariant d'imatges
MSI	Imatges d'espectrometria de masses
MSC	Correcció multiplicativa de la dispersió
NASA	Associació nacional d'aeronàutica i de l'espai
NIST	Institut nacional d'estàndards i tecnologia
NIR	Infraroig proper
PAT	Tecnologia analítica de processos
PCA	Anàlisi de components principals
PLS	Mínims quadrats parcials
PMT	Tubs fotomultiplicadors
PSF	Funció de dispersió de punt
QbD	Disseny de qualitat
RADAR	Detecció per ràdio i mesura de la distància
RMSEC	Arrel quadrada del error mitjà de la calibració
ROI	Regions d'interès
Sci	Percentatge de la contribució del senyal per a cada espècie
SIMPLISMA	Anàlisis d'automodelatge interactiu simple d'utilitzar
SIMS	Espectrometria de masses d'ions secundaris
S/N	Relació senyal soroll
SVD	Descomposició en valors singulars
ssq	Suma de quadrats dels residuals
UV	Radiació Ultraviolada

ÍNDEX

1.Objectius i estructura de la tesi

1.1. Objectius	3
1.2. Estructura de la tesi	4
1.3. Relació dels treballs científics presentats en la memòria	5

2. Introducció

2.1. Imatge hiperespectral. Descripció de la mesura i generalitats	9
2.2. Modes d'adquisició d'imatges hiperespectrals	15
2.3. Tècniques d'anàlisi utilitzades en l'adquisició d'imatges hiperespectrals	21
2.3.1. Sistema d'adquisició d'imatges IR	22
2.3.2. Sistema d'adquisició d'imatges Raman	27
2.3.3. Sistema d'adquisició d'imatges de fluorescència	31
2.3.4. Sistema d'adquisició d'imatges d'espectrometria de masses	33
2.3.5 Comparació entre els diferents sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals	37
2.4. Aplicacions i usos	40
2.4.1 Aplicacions biomèdiques i biològiques	40
2.4.2 Aplicacions en el camp agroalimentari i ambiental	45
2.4.3 Aplicacions en la tecnologia analítica de processos (PAT)	52
2.5. Bibliografia	57

3. Experimental

3.1. Presentació de les imatges hiperespectrals estudiades	69
3.2. Instrumentació	70
3.2.1. Sistemes d'adquisició d'imatges Raman	70
3.2.2. Sistemes d'adquisició d'imatges IR	73
3.3. Descripció d'imatges i estudis relacionats	78
3.3.1. Disseny d'un protocol metodològic per a la resolució individual d'imatges Raman. Estudi d'imatges de càlculs renals	78
3.3.2. Anàlisi quantitativa, qualitativa i d'heterogeneïtat de formulacions farmacèutiques. Estudi d'imatges NIR de mesclures de productes farmacèutics	79

3.3.3. Augment de la resolució espacial original de la imatge. Estudi d'imatges de la cèl·lula HeLa	82
3.3.4. Interpretació d'un procés seguit per imatges. Estudi d'imatges del sòlid carbamazepina	85
3.3.5. Disseny d'un protocol metodològic per a la identificació i diferenciació de teixits biològics. Estudi d'imatges FT-IR d'amígdals inflamades i no inflamades	88
3.3.6. Estudi de la fusió d'imatges obtingudes amb diferents tècniques espectroscòpiques. Estudi d'una mescla de productes farmacèutics mitjançant MIR i Raman	90
3.4. Bibliografia	92
 4. Tractament de les dades	
4.1. Estructura de les dades d'una imatge. Model bilineal	97
4.2. Preprocessat de la imatge	100
4.2.1. Tractament del senyal espectral	100
4.2.1.1. Correcció de la línia de base i de la distorsió del senyal	101
4.2.1.2. Suavitzat i eliminació de mesures anòmales	107
4.2.2. Tractament de la imatge	110
4.2.2.1. Compresió de la imatge	110
4.2.2.2. Transformacions espacials de la imatge	111
4.3. Anàlisi exploratòria de la imatge	112
4.3.1. Determinació del nombre de components químics presents en la imatge	112
4.3.2. Mètodes de detecció de les variables més pures	115
4.3.3 Anàlisi exploratòria de rang local en imatges (Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis)	118
4.4. Resolució d'imatges hiperespectrals: Mètode de Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS)	121
4.4.1. Resolució conjunta de diverses imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica	129
4.4.2. Resolució conjunta de diverses imatges adquirides amb diferents tècniques espectroscòpiques	132

4.5. Segmentació d'imatges	134
4.5.1. Mètode de partició: algoritme de segmentació K-means	137
4.6. Tècniques de Superresolució d'imatges	139
4.7. Bibliografia	144
 5. Resultats i discussió	
5.1. Disseny d'un protocol metodològic per a la resolució individual d'imatges Raman	151
5.1.-I <i>Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares.</i>	153
5.1.1 Discussió dels resultats	164
5.1.1.1 Resolució pel mètode MCR-ALS	164
5.1.1.2 Postprocessat dels resultats de resolució. Identificació dels components, quantificació i segmentació	166
5.1.2 Bibliografia	176
5.2 Resolució conjunta de diverses imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica	179
5.2.-I <i>Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution</i>	181
5.2.-II <i>Chemometrics Strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images: A single-cell case study</i>	195
5.2.-III <i>Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis.</i>	205
5.2.1. Discussió dels resultats	216
5.2.1.1. Resolució conjunta de diverses imatges pel mètode MCR-ALS	216
5.2.1.2. Postprocessat dels resultats de resolució	228
5.2.1.2.1. Anàlisi quantitativa global i local (escala de píxels). Estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional	229
5.2.1.2.2. Augment de la resolució espacial original de la imatge	238
5.2.2. Bibliografia	244
5.3. Disseny d'un protocol metodològic per a la identificació i diferenciació de teixits biològics mitjançant imatges hiperespectrals	247

5.3-I <i>Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues</i>	249
5.3.1. Combinació d'anàlisi multiconjunt de resolució i segmentació per a l'estudi d'imatges hiperespectrals de teixits biològics	262
5.3.2. Bibliografia	273
 5.4. Anàlisi conjunta de diverses imatges procedents de diferents plataformes espectroscòpiques	 275
5.4.1. Discussió dels resultats	275
5.4-I <i>Data fusion for multitechnique image analysis</i>	277
5.4.1.1. Transformacions espacials per a assolir la congruència espacial d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques	302
5.4.1.2. Acoblament d'imatges amb diferent resolució espacial procedents de diferents tècniques espectroscòpiques	310
5.4.2. Bibliografia	315
 6. Conclusions	 319

CAPÍTOL 1:

Objectius i estructura de la tesi

1.1.OBJECTIUS

L'adquisició i l'anàlisi d'imatges hiperespectrals és un àrea activa d'investigació que ha evolucionat ràpidament des de fa una dècada. El desenvolupament d'aquests tipus de tècniques ha despertat un gran interès, ja que proporcionen informació química (espectral) i de distribució espacial (imatge) dels constituents de les mostres. La informació de les imatges és una font molt valuosa per al control i millora de processos, l'estudi de superfícies i textures i permet aplicacions en la indústria farmacèutica, en els camps mediambiental i biomèdic i en la recerca i identificació de materials. Darrera aquesta evolució tecnològica neix la necessitat de crear eines quimiomètriques per a la correcta interpretació i emmagatzematge del gran conjunt de dades que genera la mesura instrumental.

L'objectiu general d'aquesta tesi se centra en l'adquisició i coneixement de la natura d'aquesta mesura instrumental i en el disseny i adaptació d'eines d'anàlisi de dades més específiques que permetin proporcionar protocols d'actuació per a la interpretació de les imatges hiperespectrals en funció del tipus de tècnica espectroscòpica utilitzada i del problema químic d'interès.

De manera específica, la recerca d'aquesta tesi s'orienta a estudiar el potencial del mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats, MCR-ALS, per a l'anàlisi d'una única imatge o d'un conjunt d'imatges adquirides en diferents condicions experimentals i/o amb diferents tècniques espectroscòpiques. A partir de l'estudi d'imatges procedents de diferents plataformes espectroscòpiques i diferents camps d'aplicació, es proposen protocols metodològics d'anàlisi que inclouen el preprocessat de les dades originals, l'obtenció dels mapes de distribució i espectres purs dels constituents de la imatge i el postprocessat dels mapes i espectres resolts per a obtenir informació addicional sobre els problemes en estudi.

Les tasques de preprocessament s'enfoquen a la millora del senyal espectral, amb correccions de línia de base adaptades a les diferents tècniques espectroscòpiques, i a l'assegurament de la congruència espacial entre imatges obtingudes sobre la mateixa mostra amb diferents tècniques espectroscòpiques. En les tasques de resolució, es proposa l'anàlisi multiconjunt clàssica per a

tractar imatges recollides amb la mateixa tècnica i la variant de MCR-ALS que tracta estructures multiconjunt incompletes per a l'anàlisi d'imatges procedents de diferents tècniques amb diferent resolució espacial. El postprocessat dels espectres resolts s'orienta a tasques d'identificació de constituents, mentre que l'ús dels mapes de distribució resolts obre un gran ventall de possibilitats, que inclouen la quantificació i estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional dels constituents presents en la imatge o la descripció de l'evolució global i local-espacial d'un procés. Els mapes de distribució resolts són també una excel·lent informació de partida en altres tipus d'anàlisi, com la segmentació, o en procediments per a l'augment de la resolució espacial d'una imatge (superresolució) per combinació de mapes de distribució resolts procedents de l'anàlisi multiconjunt d'un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial.

Dins dels camps d'aplicació estudiats, cal destacar el farmacèutic i l'estudi de mostres biològiques, que són les que han demanat protocols d'anàlisi més complexos, adaptats a la dificultat del problema químic i a les lleugeres variacions dels senyals espectrals mesurats.

1.2 ESTRUCTURA DE LA TESI

La present memòria està estructurada en sis capítols amb la informació que tot seguit es descriu. En el primer capítol es descriuen els objectius que han motivat la realització d'aquesta tesi i la forma en què es troba estructurada.

En el segon capítol es fa una introducció general sobre les imatges hiperespectrals, que inclou aspectes com l'evolució i estructura de la mesura, principals avantatges i dificultats d'ús. A continuació s'expliquen els sistemes d'adquisició de la mesura, on es descriuen els diferents modes de registre i les tècniques espectroscòpiques utilitzades en l'adquisició de les imatges. En aquest capítol també es comenten els diferents àmbits d'aplicació en què les imatges hiperespectrals són de gran interès.

En el tercer capítol es recullen les característiques dels sistemes d'adquisició d'imatges emprats en aquesta tesi i es descriuen els tipus de mostra estudiats, els modes d'adquisició de les mesures i les imatges registrades.

En el quart capítol es descriuen els mètodes quimiomètrics emprats per a l'anàlisi de les imatges, que inclouen el preprocessat de les dades originals, l'aplicació de mètodes de resolució per a l'obtenció dels mapes de distribució i espectres purs dels constituents presents en la imatge i el postprocessat dels mapes i espectres resoltos en funció del problema químic d'interès.

En el cinquè capítol es presenten detalladament els resultats obtinguts en els treballs que s'han dut a terme en aquesta tesi, dividits en quatre blocs temàtics. El primer bloc mostra el disseny d'un protocol metodològic per a la resolució individual d'una imatge Raman mitjançant el mètode MCR-ALS i per a la posterior identificació, quantificació dels components i segmentació de la imatge. El segon bloc recull resultats obtinguts de l'anàlisi conjunta per MCR-ALS d'imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica. Aquests exemples s'orienten a l'anàlisi quantitativa a nivell global i de píxel i a l'estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional en un conjunt de mostres farmacèutiques; a la interpretació d'un procés seguit per imatges i a l'augment de la resolució espacial original d'un sistema d'adquisició d'imatges per combinació de la informació d'imatges de baixa resolució espacial amb informació complementària. El tercer bloc mostra el disseny d'un protocol metodològic que combina anàlisis multiconjunt de resolució i segmentació d'imatges per a la identificació i diferenciació de poblacions de teixits biològics amb estats patològics distints. Finalment, el quart bloc presenta l'estudi de la resolució conjunta d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques, que inclou el disseny d'un preprocessat per a assegurar la congruència espacial necessària per a l'acoblament de les imatges i soluciona el problema de les diferències de resolució espacial entre tècniques.

En el sisè capítol es recullen les conclusions generals més importants de la tesi.

1.3 RELACIÓ DELS TREBALLS CIENTÍFICS PRESENTATS EN LA MEMÒRIA

1.Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares.

Autors: Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Romà Tauler i Anna de Juan.

Revista: Analytica Chimica Acta 702 (2011) 182-192.

2. Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution.

Autors: Sara Piqueras, James Burger, Romà Tauler i Anna de Juan.

Revista: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 117 (2012) 169 - 182.

3. Chemometric Strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images: a single-cell case study.

Autors: Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Marc Offroy, Frédéric Jamme, Romà Tauler i Anna de Juan.

Revista: Analytical Chemistry 85 (2013) 6303-6311.

4. Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis.

Autors: Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Romà Tauler i Anna de Juan.

Revista: Analytical Chimica Acta 819 (2013) 15-25

5. Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues

Autors: Sara Piqueras, Christoph Krafft, Claudia Beleites, Kokila Egodage, Ferdinand von Eggeling, Orlando Guntinas-Lichius, Juergen Popp, Romà Tauler i Anna de Juan.

Revista: Analytica Chimica Acta 881(2015) 24-36

6. Data fusion for multitechnique image analysis

Autors: Sara Piqueras, Marcel Maeder, Romà Tauler i Anna de Juan (enviat a Analytica Chemistry).

CAPÍTOL 2:

Introducció

2.1. IMATGE HIPERESPECTRAL. DESCRIPCIÓ DE LA MESURA I GENERALITATS

Les imatges hiperespectrals són un tipus particular de mesura espectroscòpica que proporciona informació espectral i espacial sobre la mostra. La imatge s'adquireix compartimentant la mostra en petites àrees anomenades píxels o en petits volums anomenats vòxels, sobre cadascun dels quals s'enregistra un espectre. Així doncs, la informació que conté una imatge hiperespectral es troba estructurada en un cub de dades, tal i com es mostra en la figura 2.1.1, on dues de les dimensions són les coordenades espacials dels píxels (x i y) i la tercera dimensió es l'espectral (λ).

La informació sobre la composició química de la mostra en una imatge hiperespectral s'obté mitjançant l'exploració dels espectres registrats i la interpretació de les seves bandes, o bé per comparació amb una biblioteca d'espectres. En canvi, la informació sobre la distribució de les espècies químiques en la superfície de la mostra es relaciona amb la variació espectral que s'observa entre els píxels o vòxels de la imatge.

La combinació de les tècniques espectroscòpiques amb la tecnologia pròpia d'adquisició d'imatges fa de les imatges hiperespectrals una mesura única en el seu gènere, la singularitat de la qual rau en el fet de proporcionar informació global (identificació i quantificació de constituents) i local (distribució espacial dels constituents) sobre les mostres analitzades.

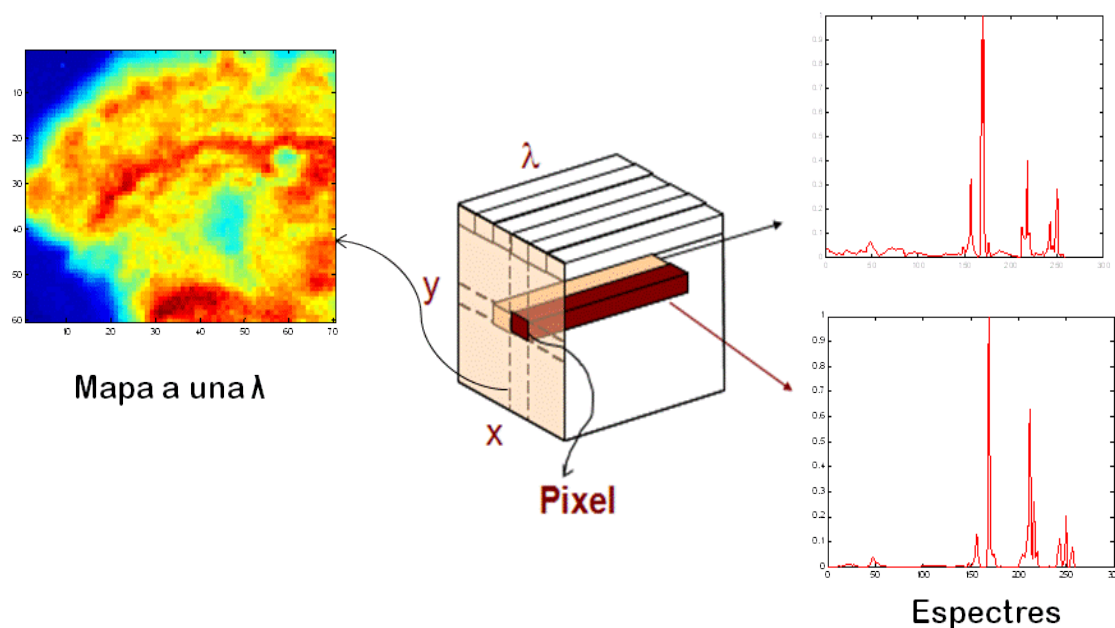


Figura 2.1.1 Estructura de les dades d'una imatge hiperspectral. A la dreta es mostren els espectres dels píxels; a l'esquerra, la imatge corresponent a una longitud d'ona.

L'evolució natural de les imatges hiperspectrals comença amb les imatges digitals i de color, que van néixer sense tenir com a objectiu cap estudi químic. En general, una imatge és una representació visual que posa de manifest l'aparença d'un objecte. La llum incideix sobre un objecte i les longituds d'ona reflectides en la superfície generen la imatge de l'objecte ¹. La primera manera d'emmagatzemar la informació procedent d'una imatge va ser la imatge digital, que és una representació bidimensional de la imatge, que utilitza bits. Una imatge en blanc i negre representa cada píxel amb un bit (de valor 1 o 0). Quan es codifica una imatge en escala de grisos, cada píxel necessita 8 bits per a ser definit, la qual cosa permet diferenciar 256 tons de grisos en l'escala que va del blanc al negre. Una imatge digital en escala de grisos està constituïda per $[I \times J]$ píxels, estructurats en una matriu $I \times J$, on cada valor representa un píxel amb el seu to de gris ²⁻⁴.

La primera imatge escanejada, emmagatzemada, i digitalitzada va aparèixer al 1957 a *Standards Eastern Automatic Computer* de l'Oficina General d'Estàndards (NIST), quan Rusell Kirsch (científic de NIST) va captar una imatge del seu fill de tres mesos. La presència de línies sobre la

imatge representada en la figura 2.1.2 indica la baixíssima resolució espacial, inevitable donada la poca capacitat d'emmagatzematge dels ordenadors d'aquella època.



Figura 2.1.2 Primera imatge escanejada del fill de Rusell Kirsch (1957).

Posteriorment van aparèixer les imatges en color, també anomenades RGB. La descripció RGB fa referència al nom dels colors vermell (red), verd (green) i blau (blue). És un model de color basat en la síntesi additiva, amb el qual és possible representar un color mitjançant la barreja per addició dels tres canals de color esmentats. En aquest cas, una imatge RGB es defineix mitjançant un cub de mida $[I \times J \times 3]$ on I i J són el nombre de píxels en les dues dimensions espacials i el tres fa referència als valors d'intensitat de color per als canals vermell, verd i blau, respectivament.

Les imatges RGB es van començar a utilitzar en escàners. En la figura 2.1.3 es pot veure l'esquema d'un escàner en color, on la font il·lumina la imatge, la llum reflectida és escanejada per les lents i passa per un divisor de feix que divideix la llum en els tres canals espectrals vermell, verd i blau. Altres dispositius com monitors d'ordinadors, televisors, càmeres de vídeo i digitals també es basen en l'ús de les imatges RGB.

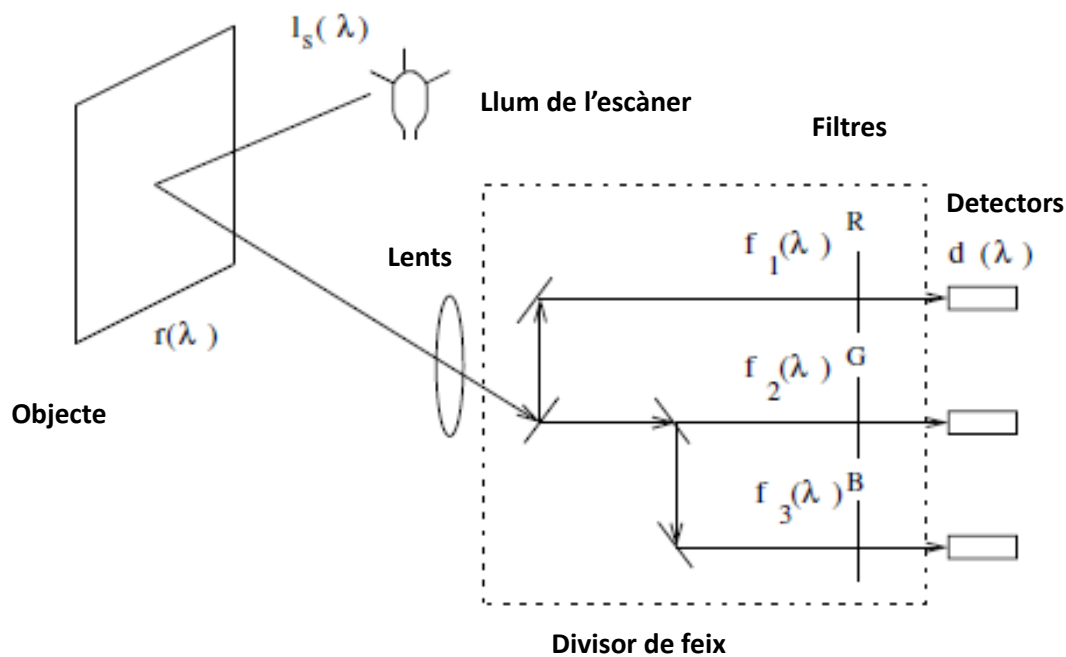


Figura 2.1.3 Esquema d'un escàner a color

Després de l'aparició de la possibilitat de codificar el color de les imatges amb el sistema RGB, es va passar fàcilment a dissenyar dispositius simples d'adquisició d'imatges amb detectors sensibles a la llum d'un nombre limitat de canals espectrals. Així van néixer les imatges multiespectrals, que són una representació de la imatge que utilitza com a canals per a definir cada píxel mesures recollides a diferents freqüències de l'espectre electromagnètic. La imatge multiespectral és un cub de dimensió $I \times J \times K$, on $I \times J$ són els píxels i K un nombre reduït de canals espectrals. Originalment, les imatges multiespectrals van ser desenvolupades per a obtenir imatges de l'espai en mode de sensors remots. TIROS-1 va ser el primer satèl·lit meteorològic llançat l'abril de 1960. Aquest satèl·lit es va dissenyar per analitzar el clima atmosfèric de la Terra i treballava recollint mesures en un interval de longituds d'ona de 250-1200 nm. La seva tecnologia ha estat heretada per la majoria de satèl·lits de la NASA. Les imatges multiespectrals es van desenvolupar inicialment per realitzar anàlisis del clima de la Terra però poc a poc van resultar útils per a aplicacions militars ^{5,6} i també van prendre importància en el camp de la medicina⁷.

El concepte d'imatge hiperespectral sorgeix al voltant de 1980, quan apareixen limitacions en l'anàlisi de la terra mitjançant l'adquisició d'imatges multiespectrals. La manca d'especificitat i la falta d'informació d'espècies presents en la superfície terrestre va donar lloc a la construcció de l'*Airbone Imaging Spectrometer* i seguidament de l'*Advanced Visible and Infrared Imaging Spectrometer* (AVIRIS). En la taula 2.1.1 es mostra el llistat dels primers dispositius hiperespectrals (1985-1989) i els seus posteriors avenços.

Taula 2.1.1. Llista dels primers instruments d'adquisició d'imatges hiperespectrals i els seus posteriors avenços.

Nom	Any	País	Interval espectral (μm)	Bandes
Automatic Identification System (AIS)	1985	USA	0,7-2,5	128
Fluorescence Line Imager (FLI)	1987	Canada	0,4-1,0	288
Airbone Visible/Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS)	1989	USA	0,4-2,5	224
Compact Airbone Spectrographic Imager (CASI)	1989	Canada	0,4-1,0	288
Shortwave Infrared Full Spectrum Imager (SFSI)	1993	Canada	1,2-2,4	122
Airbone hyperspectral images (Hymap)	1998	Australia	0,4-2,5	128
Airbone Reflective Emissive Spectrometer (ARES)	2005	Australia	0,4-2,5 8-12	128 32

Aquests nous sistemes tenien com a objectiu principal l'adquisició d'imatges amb un gran nombre de bandes espectrals (entre 100-300 bandes a intervals entre 10-20 nm). Aquest augment de la resolució espectral va comportar una millora en la identificació i classificació de la majoria dels constituents de la superfície terrestre, els quals no podien ser distingits mitjançant l'ús de les imatges multiespectrals⁸⁻¹¹.

Les imatges hiperespectrals també van ser un avenç molt important per al diagnòstic mèdic, ja que l'ús d'aquests sistemes va permetre la detecció de malalties i localització de teixits afectats sense la necessitat d'emprar un tractament invasiu que fes malbé el teixit biològic¹². També van suposar una revolució dins el camp analític, ja que permeten conèixer la identitat, la distribució i la proporció de les espècies químiques en una mostra a escala local i global. A més a més les tècniques d'adquisició d'imatges hiperespectrals requereixen un pretractament mínim de la mostra i no solen ser destructives.

L'evolució de l'adquisició i aplicacions de les imatges hiperespectrals ha dut al disseny de sistemes que poden ser utilitzats al laboratori per a adquirir imatges sobre mostres de mida molt més petita. A escala de laboratori, les tècniques d'imatge hiperespectral han trobat molts usos en la indústria alimentària^{13,14}, farmacèutica, la ciència de materials, els camps biomèdic i ambiental i en el control de processos.

Les imatges hiperespectrals estan constituïdes per una gran quantitat d'informació d'alta qualitat, fet que dificulta el tractament i emmagatzematge de les dades. D'aquí neix la necessitat de crear eines d'anàlisi de dades apropiades per a estudiar i interpretar la informació que contenen. L'ús d'eines quimiomètriques en l'anàlisi de les imatges hiperespectrals és decisiu per extreure la màxima informació de la mesura. S'han desenvolupat alguns algorismes d'exploració i d'anàlisi d'imatges; no obstant això, és una àrea de recerca activa que es troba en constant evolució.

En aquests últims anys, l'anàlisi de dades s'ha centrat en l'exploració de la informació espectral i espacial continguda en la imatge (conegut amb el nom d'anàlisi multivariant de la imatge, MIA) i en l'agrupació de píxels en funció de la seva similitud espectral (segmentació de la imatge)¹⁵⁻¹⁸. El constant interès i l'àmplia gamma d'aplicacions de les imatges hiperespectrals fa que el desenvolupament de la tècnica i els protocols d'anàlisi de la mesura siguin continus.

Com a conseqüència, l'objectiu general d'aquesta tesi s'orienta al coneixement i a l'adquisició d'imatges hiperespectrals per tal de dissenyar i desenvolupar eines quimiomètriques adaptades al tipus de mesura i problema químic d'interès. Es pretén, doncs, crear metodologies d'anàlisi

generals d'ús senzill i fàcil per a la interpretació de la informació química continguda en les imatges hiperespectrals.

2.2. MODES D'ADQUISICIÓ D'IMATGES HIPERESPECTRALS

La imatge hiperespectral és una fusió de l'espectroscòpia convencional i el concepte d'imatge. Els sistemes d'adquisició d'imatges consten dels components d'un espectrofotòmetre clàssic (vegeu la figura 2.2.1) i els components addicionals responsables de cobrir la informació espacial, com són un microscopi i una càmera acoblats a una plataforma mòbil, que asseguren el moviment espacial precís i acurat de la mostra sota el feix de llum.

Un espectrofotòmetre clàssic consta d'una font de radiació, un monocromador o un sistema de filtres que dispersa la llum en les bandes de longitud d'ona, un compartiment per a la mostra i un sistema de detecció, que inclou el detector i els dispositius necessaris per a la traducció del senyal (vegeu figura 2.2.1).

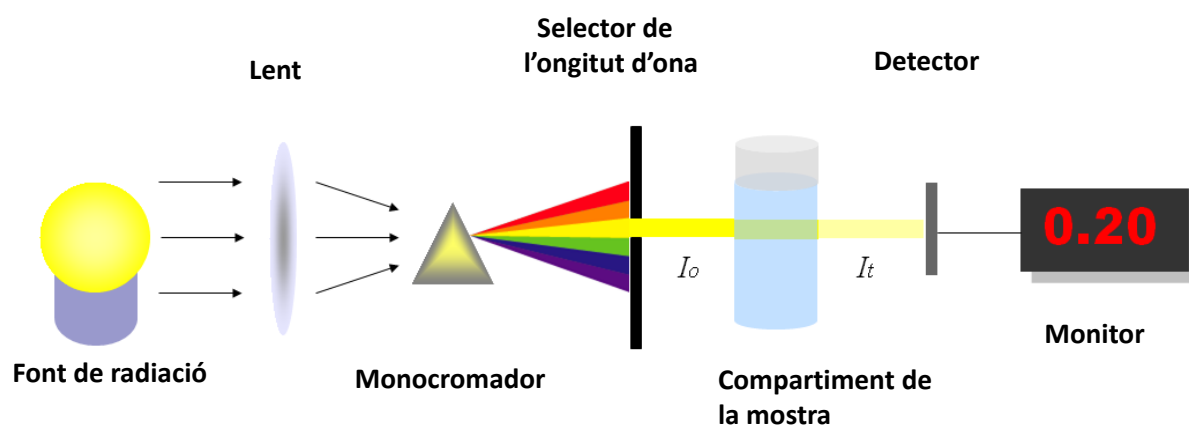


Figura 2.2.1 Estructura d'un espectrofotòmetre convencional

La càmera d'un espectrofotòmetre dissenyat per a l'adquisició d'imatges hiperespectrals consta d'un conjunt d'accessoris necessaris per a l'obtenció de la informació espectral i un conjunt addicional necessari per a l'adquisició d'informació espacial. La informació espacial resulta de la configuració de l'òptica de l'espectrofotòmetre, del moviment controlat de la mostra o de la combinació d'ambdós factors. Respecte a l'obtenció de la informació espacial, es poden diferenciar tres modes de registre de la imatge: l'escombratge per píxels individuals (*point scanning* o *whisker broom*), per línies de píxels (*line scanning*) o per pla focal (*focal plane scanning*). A continuació, es descriuen aquests tres modes d'adquisició, prenent com a exemple un sistema d'adquisició d'imatges que registra mesures de reflectància difusa.

El mode d'adquisició *point scanning* o *whisker broom* mesura els espectres de la imatge píxel per píxel (figura 2.2.2). La llum reflectida per un píxel de la mostra es dispersa a través d'un prisma o un element òptic de dispersió similar i longitud per longitud d'ona és recollida per cadascun dels elements que formen part del detector lineal. La platina mòbil sobre la qual es disposa la mostra es va movent sistemàticament en les direccions x i y , segons les coordenades espacials que defineixen cada píxel fins que s'adquireix una imatge hiperespectral completa. D'aquesta forma, la imatge adquirida és escanejada en la dimensió espacial i espectral^{16,19}.

Aquest mode de treball presenta una molt bona resolució espacial, però requereix un temps llarg d'adquisició ja que cada espectre es enregistra individualment i és necessari el reposicionament de la mostra per a cadascun dels píxels. Una de les limitacions que presenta aquest mode està lligada a la gran precisió espacial que ha de tenir la platina motoritzada per al correcte reposicionament de la mostra en les coordenades d'un píxel determinat.^{20,21}

Point scan (whisker-broom configuration)

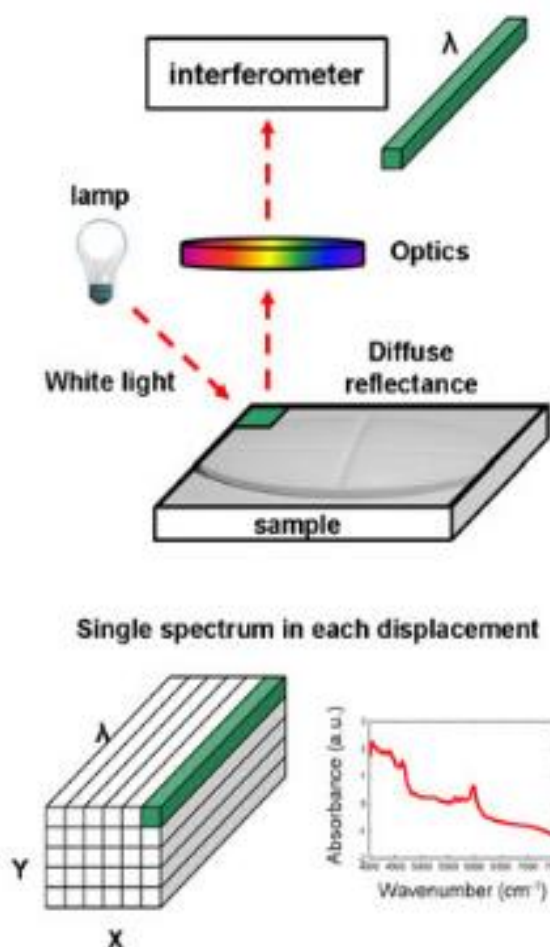


Figura 2.2.2 Representació del registre d'una imatge hiperespectral en mode de *point scanning* o configuració *Whisker-broom*.

El mode *line scanning* o *push-broom* enregistra els espectres de la imatge per línies de píxels (vegeu figura 2.2.3). La llum que incideix en la mostra és una línia estreta de radiació i el senyal reflectit per la mostra passa per una escletxa òptica que el condueix al detector. En aquest disseny, s'utilitza un detector de dues dimensions perpendicular a la superfície de la mostra per escanejar àrees en una de les dues dimensions de la imatge. Un conjunt de sensors es troben alineats en el detector i capten els espectres complets de tota una línia de píxels a la vegada. La mostra es va movent sistemàticament en una sola direcció (*scan line*) fins que s'adquireix la imatge completa.

Aquest mode de registre permet obtenir la imatge en menor temps que el mode *point scanning*, per contra, la qualitat dels espectres disminueix lleugerament. El mode *line scanning* és ideal quan es volen adquirir imatges en continu i *on-line*, ja que el sistema de moviment de la mostra pot ser una cinta transportadora^{14,22–24}. En aquest cas, una de les dimensions del píxel, la relacionada amb la distància entre els píxels en la línia adquirida, és fixa i depèn de la configuració de l'instrument.

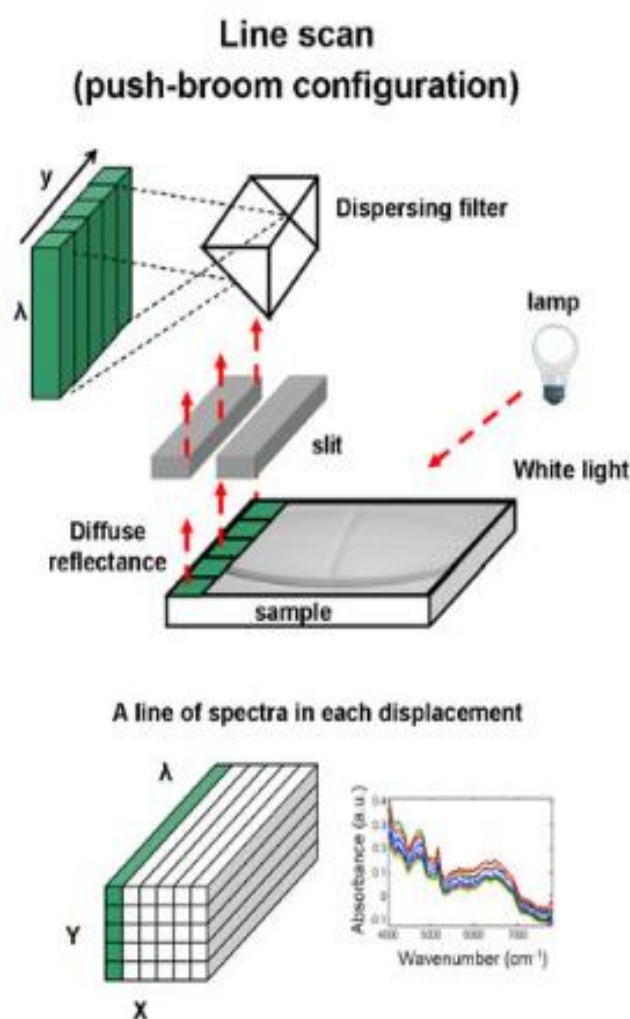


Figura 2.2.3 Representació del registre d'una imatge hiperspectral en mode *line scanning* o en configuració *pushbroom*.

L'últim mode de registre de les imatges és el de pla focal (*focal plane scanning*), que es mostra en la figura 2.2.4. En aquest mode, el detector es troba en un pla paral·lel a la superfície de la mostra i la imatge de la mostra és projectada sobre el detector de pla focal. La càmera, les lents i els components de l'espectrofotòmetre i la mateixa mostra es troben fixats en una posició relativa al detector. S'adquireixen imatges de tota la superfície de la mostra a cada longitud d'ona. Actualment s'utilitzen filtres sintonitzables i interferòmetres. Els filtres més comunament emprats són el filtre de cristall líquid sintonizable (LCTFs) i el filtre sintonizable optoacústic (ATCs). En aquest mode d'adquisició de la imatge la mida de píxel es troba fixada en les dues direccions. La mida de píxel depèn bàsicament de la configuració del detector. El detector més emprat comunament és el detector FPA (*focal plane array*). El detector FPA sovint adquireix el senyal de tota la superfície de mostra desitjada, però també s'utilitza en mode mosaic. És a dir, s'adquireixen unes quantes imatges sobre superfícies contigües de la mostra, que l'instrument compona per a proporcionar una imatge total de mida més gran.

El temps d'anàlisi d'aquest mode de registre es redueix considerablement respecte als dos anteriors i, en conseqüència, la qualitat de la imatge²⁵.

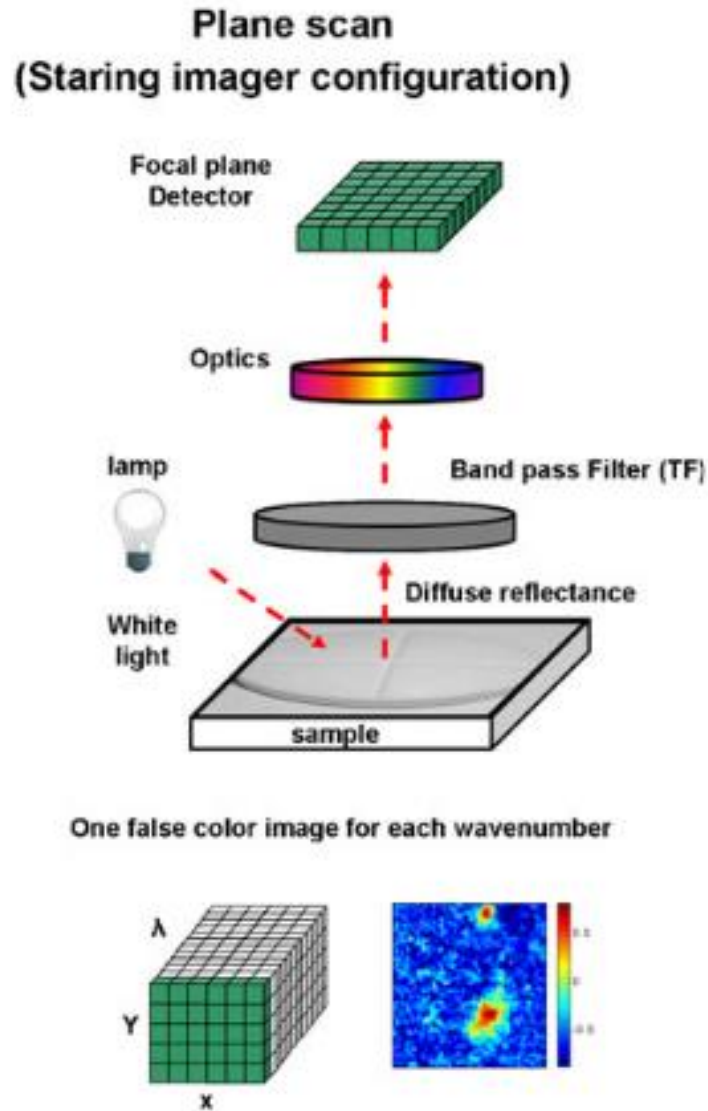


Figura 2.2.4 Representació del registre d'una imatge hiperespectral en mode focal plane scanning.

La tria del mode d'adquisició d'una imatge depèn de la resolució espacial i espectral desitjades, del temps d'anàlisi i del tipus d'informació que es vulgui obtenir de la mostra.

Els termes *mapping* i *imaging* també són utilitzats per referir-se als modes d'adquisició de les imatges hiperespectrals. Una imatge adquirida mitjançant *mapping* recull sempre l'espectre complet de regions contigües de la mostra. Aquest mode d'adquisició s'aconsegueix movent cada regió de la mostra en el focus del feix del microscopi després que l'espectre o espectres de la regió anterior hagin estat mesurats. El procés es repeteix fins que tota la regió d'interès estigui

coberta. El terme *mapping* és aplicable al mode *point scanning* quan la mostra es mou en les dues direccions espacials i es recull un espectre per a cadascun dels píxels en què es troba compartimentada, i al mode *line scanning*, quan la mostra es mou en una sola direcció espacial i s'enregistren els espectres de la imatge per línies de píxels. En canvi, el mode *imaging* recull imatges completes a diferents longituds d'ona. Aquest terme és aplicable al mode de treball *focal plane scanning*²⁵.

2.3 TÈCNIQUES D'ANÀLISI UTILITZADES EN L'ADQUISICIÓ D'IMATGES HIPERESPECTRALS

Les imatges hiperespectrals poden ser obtingudes mitjançant espectroscòpies d'absorció molecular a l'infraroig proper, mitjà i UV-Visible, espectroscòpia Raman i espectroscòpia de fluorescència, i també mitjançant espectrometria de masses.

L'espectroscòpia NIR mesura l'absorció en la regió de l'infraroig proper (700-2500 nm), el MIR en la regió de l'infraroig mitjà (2500-5000 nm), i l'UV-Visible en la regió ultraviolat-visible (400-800 nm). L'espectroscòpia Raman és una tècnica de dispersió, que mesura la intensitat i freqüència de fotons que es dispersen en la mostra i que és efectiva en l'interval 250-3500 cm^{-1} . L'espectroscòpia de fluorescència mesura la intensitat de fluorescència emesa per una substància que ha estat exposada a radiacions ultraviolat-visible. En canvi l'espectrometria de masses no és una tècnica òptica sinó que és una tècnica d'anàlisi que analitza amb gran precisió la composició de diferents elements químics i isòtops atòmics separant els nuclis atòmics en funció de la seva relació massa-càrrega (z/m).

Tot i que la tesi se centra en l'ús d'imatges IR i Raman, també s'ha volgut descriure altres tècniques que són de gran rellevància dins l'àmbit analític i industrial.

2.3.1 Sistema d'adquisició d'imatges IR

Components instrumentals

Els sistemes d'adquisició d'imatges l'IR consten d'una font de radiació, dels dispositius de dispersió, d'un microscopi òptic, del compartiment de la mostra, de sistemes de detecció que inclouen el detector i els dispositius necessaris per a la traducció del senyal i dels mecanismes responsables del control del moviment de la mostra per a l'obtenció de la informació espacial.

La font de radiació més utilitzada és la làmpada halògena de filament de tungstè amb finestra de quarz, capaç de proporcionar un espectre continu en la regió de 320-2500 nm. Els díodes d'emissió de llum o LEDS també emeten radiació NIR en un interval estret de longituds d'ona. Làmpades de ceràmica i nicrom s'empren com a font de radiació MIR i FIR. Pel que fa a la radiació d'excitació de sincrotró, és una font d'emissió d'alt rendiment IR que ha experimentat una gran evolució durant aquest últims deu anys i que és especialment important per la gran lluminositat i coherència del feix de llum, que dona la possibilitat d'obtenir informació espectroscòpica d'alta resolució espacial. Aquest tipus de font d'emissió resulta de gran interès en l'àmbit biomèdic per a l'exploració de cèl·lules i teixits biològics, ja que permet distingir les diferents subregions cel·lulars. També s'usa en d'altres àrees científiques com la caracterització de biomaterials, geologia, anàlisi forense...²⁶⁻²⁹.

Pel que fa als dispositius de dispersió, els monocromadors i filtres de roda es troben cada cop més en desús, ja que tan sols poden sintonitzar un interval estret de longituds d'ona en un temps relativament lent^{30,31}. El filtre de cristall líquid sintonizable (LCFs) i el filtre sintonizable optoacústic (AOTFs) són els més emprats en els sistemes d'adquisició d'imatges, tal i com s'ha comentat anteriorment, ja que es poden ajustar a un interval espectral ampli (des de l'IR proper al mitjà) en un temps molt més ràpid (de micro a milisegons)^{30,32-39}.

En les dues últimes dècades, els espectrofotòmetres d'infraroig dispersiu convencionals han estat substituïts per equips d'infraroig amb transformada de Fourier, els quals incorporen un interferòmetre de Michelson⁴⁰⁻⁴² i presenten tota una sèrie d'avantatges respecte als equips

dispersius, com una major quantitat d'energia i una mesura simultània en tot l'interval espectral⁴³. Gràcies a aquestes millores, la microscòpia d'infraroig ha tingut un gran desenvolupament en els últims anys degut a la possibilitat d'adaptar nous accessoris als espectròmetres i poder analitzar mostres de les quals era impossible obtenir un espectre fa anys. Entre aquests accessoris trobem el de reflexió difusa, reflexió total atenuada...

Els microscopis són acoblats als espectrofotòmetres FT-IR i són capaços de dur a terme mesures de transmissió, reflexió i reflexió total atenuada a escala microscòpica i macroscòpica. Els microscopis disposen d'un dispositiu constituït per diferents objectius muntats simultàniament, entre els quals es poden incloure objectius visibles i objectius *Cassegrain*. Els objectius *Cassegrain* són objectius que produeixen imatges d'elevada qualitat sense aberracions cromàtiques, i disposen d'un diafragma d'apertura variable situat en el pla de la imatge que permet la selecció de l'àrea d'anàlisi. Els microscopis d'infraroig solen incloure els objectius Cassegrain de 15x i 32x per a mesures de transmissió i reflexió. El microscopi també pot contenir un objectiu ATR de germani, seleniür de zinc o diamant amb sensor de pressió.

Un cop la radiació és dispersada, la llum reflectida o transmesa és recollida per l'objectiu i passa al detector. El detector de pla focal (FPA) és el que avui en dia presenta el màxim avantatge en els sistemes d'adquisició d'imatges a l'IR. Aquests detectors estan compostos per milers de detectors individuals (píxels), que enregistren imatges de tota l'àrea de la mostra a cadascuna de les longituds d'ona desitjades en un temps molt ràpid i proporcionant un soroll de fons uniforme⁴⁴⁻⁵⁰. Malgrat l'ús majoritari de detectors FPA i modes de registre focal plane scanning, no s'ha d'oblidar que els sistemes MIR també poden treballar en mode *point scanning* i que els sistemes NIR per a control on-line utilitzen els detectors propis del mode *line scanning*.

Tipus de senyal i tractament del senyal

Els sistemes d'adquisició d'imatges a l'infraroig permeten enregistrar imatges de mostres sòlides, líquides i semilíquides. En funció del tipus de mostra, la mesura es pot dur a terme en mode de reflectància, transmissió o transflectància. La diferència bàsica entre els tres tipus de mesura és la posició de la mostra i del detector a l'instrument^{41,51,52}, tal i com es mostra a la figura 2.3.1.1.

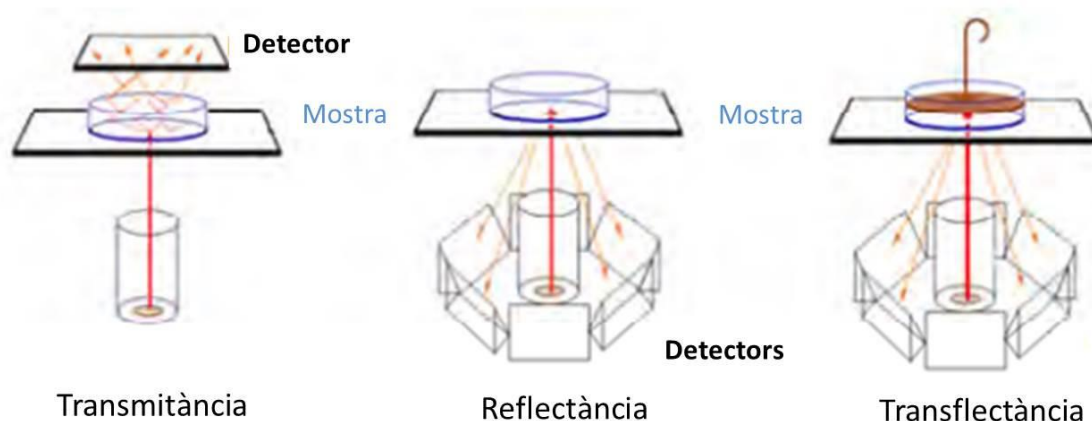


Figura 2.3.1.1 Esquema dels 3 modes de registre de l'espectre d'absorció.

En el mode de transmissió el feix de llum travessa la mostra fins al detector. Per tal que el senyal arribi al detector, la mostra ha de ser bastant transparent o de gruix limitat. Aquest mode és àmpliament emprat en mostres fines com plàstics i seccions de teixits.

En les mesures de reflectància, el feix de llum és reflectit per la pròpia mostra i és recollit pel detector. Aquest mode s'empra per mostres gruixudes incapaces de transmetre la llum⁵³. Els dos tipus de reflexió d'ús comú en l'anàlisi d'imatges són la reflexió difusa (DR) i la reflexió total atenuada (ATR). En les mesures DR, la radiació es dispersa en interactuar amb les partícules de la mostra i la fracció reflectida per la mostra és enregistrada pel detector. NIR-DR s'utilitza àmpliament per a l'anàlisi d'imatges de mostres no transparents de gran gruix en diverses aplicacions no invasives, sobretot en la indústria alimentària i farmacèutica^{19,25,54-58}. Per altra banda, en les mesures de reflexió total atenuada (ATR), la radiació infraroja es projecta en un cristall d'alt índex de refracció^{53,59}. El feix es reflecteix en la cara interna del cristall i crea una ona evanescent que penetra en la mostra entre 2 i 12 μm . La mostra ha d'estar en íntim contacte amb el cristall. Part de l'energia de l'ona evanescent és absorbida i la radiació reflectida és conduïda al detector (vegeu figura 2.3.1.2). Es tracta d'un mètode molt versàtil que permet la mesura de mostres líquides i sòlides sense pràcticament preparació de les mostres, així que aquest mode de registre presenta importants aplicacions dins l'àmbit biomèdic, farmacèutic i en la ciència de materials⁶⁰⁻⁶⁴.

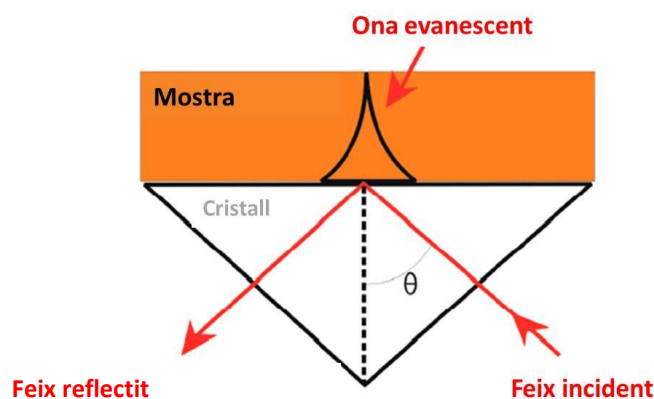


Figura 2.3.1.2 Esquema del fenomen de la reflexió total atenuada (ATR).

Finalment, un cas intermedi l'ocupen les mesures de transfectància, on el feix de llum travessa la mostra, es reflecteix en un reflector que hi és en contacte i finalment arriba al detector ^{41,51}.

Escala de la imatge, modes d'adquisició

Els sistemes d'adquisició d'imatge IR poden treballar en mode microscòpic o macroscòpic segons la informació espacial desitjada. Depenent del mode espacial d'adquisició, el disseny de l'instrument varia. Per a mostres de mida petita (microscòpica), el sistema d'imatges d'IR estan formats per un espectrofotòmetre clàssic acoblat a un microscopi (tal i com ja s'ha esmentat en l'apartat 2.2) i un condensador. El condensador concentra la radiació infraroja generada cap a la mostra. La mostra es col·loca sobre la platina mecànica motoritzada, que permet petits increments de moviment, de manera que es poden adquirir imatges d'alta resolució espacial sobre la superfície de la mostra que es vol analitzar.

Per a mostres de mida gran (macroscòpica), el detector FPA i la càmera CCD van connectats a una macrocàmbra que conté un compartiment òptic i un compartiment per a la mostra. L'àrea de la imatge depèn de la dimensió del detector. El detector FPA adquireix imatges de tota la superfície il·luminada de la mostra en un temps molt ràpid. Àrees de centímetres quadrats poden ser adquirides en mode macroscòpic.

En la figura 2.3.1.3 es mostra un sistema d'adquisició d'imatges FT-IR amb tecnologia força avançada. Aquest sistema FT-IR és molt versàtil i comprèn la regió espectral des de la zona de l'infraroig proper fins l'infraroig mitjà, és capaç de treballar en mode de transmitància, reflectància i reflectància total atenuada a nivell microscòpic i macroscòpic. Mostres de micres a centímetres quadrats poden ser analitzades mitjançant l'ús d'un objectiu per a mostres de grans dimensions, en lloc de l'ús de macrocambres, fent així més portàtil l'instrument. També l'ús del camp d'expansió òptic permet analitzar mostres de dimensions més grans en menys temps, mentre es manté una excel·lent resolució espacial i una bona relació S / N.

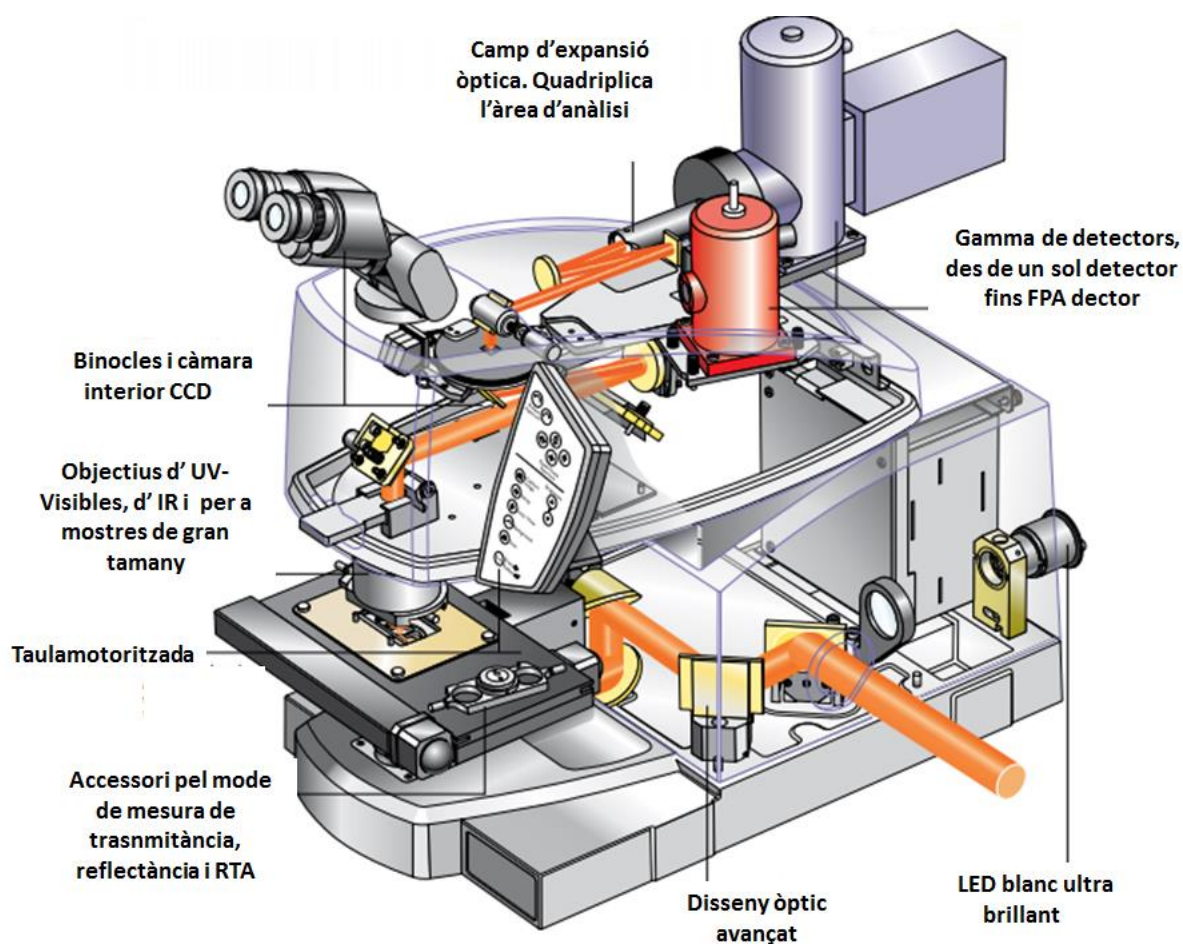


Figura 2.3.1.3 Esquema del sistema d'adquisició d'imatges FT-IR VARIAN 620-IR de la companyia Agilent.

Per altra banda, els modes de registre més comuns en els sistemes d'imatges d'IR són el *line scanning* i el focal *plane scanning*. El mode *line scanning* presenta una elevada resolució espacial, però requereix un temps d'anàlisi més llarg. Últimament s'han dissenyat prototips que treballen en mode *line scanning* i poden analitzar mostres *on-line* que circulen en una cinta transportadora de manera molt ràpida. Aquest mode és àmpliament emprat en l'àmbit industrial, ja que es poden obtenir imatges a temps real que permeten el seguiment i control de diferents etapes dels processos industrials. Generalment, no cal obtenir una alta resolució espectral en la zona de l'infraroig, ja que les bandes d'absorció són molt amples. Per això, sovint es treballa en mode focal *plane scanning*. El mode focal *plane scanning* presenta una elevada flexibilitat quant a la mida i forma de la mostra.

2.3.2 Sistema d'adquisició d'imatges Raman

Components instrumentals

Els principals components dels sistemes d'adquisició d'imatges Raman són un làser d'excitació, un microscopi òptic, un monocromador, una xarxa de difracció i un detector.

La font de radiació és una llum monocromàtica, que pot ser un làser en la regió del visible, de l'infraroig proper o de l'UV proper. El làser Nd:YAG (532 nm, 1024 nm), el làser de He-Ne (632 nm) i els làsers de díode, els quals irradien a 785 nm i 840 nm, són els més emprats en l'àmbit analític. El làser es col·loca darrere i en paral·lel a l'espectrofotòmetre. El feix del làser (vegeu línia discontinua de la figura 2.3.2.1) es dirigeix al microscopi a través d'un sistema de lents i els fotons associats a l'efecte Raman s'envien a través d'un monocromador al detector.

L'anomenat efecte Raman és una dispersió inelàstica d'un fotó. Quan la llum d'un àtom o molècula és dispersada, la majoria de fotons són dispersats elàsticament (difusió de Rayleigh). No obstant, una petita fracció de la llum és dispersada òpticament a freqüències diferents. Els fotons reflectits i els fotons obtinguts per dispersió de Rayleigh són la major font d'interferència en l'espectroscòpia Raman, de manera que han de ser eliminats per evitar possibles saturacions

detector. Això s'aconsegueix mitjançant l'ús d'un filtre hologràfic (com es pot veure en la figura 2.3.2.1) o a través de monocromadors o escletxes petites. Un cop eliminats els fotons d'interferència, els fotons Raman són dispersats en la xarxa de difracció i finalment detectats pel dispositiu de càrrega acoblada (CCD) ⁶⁵.

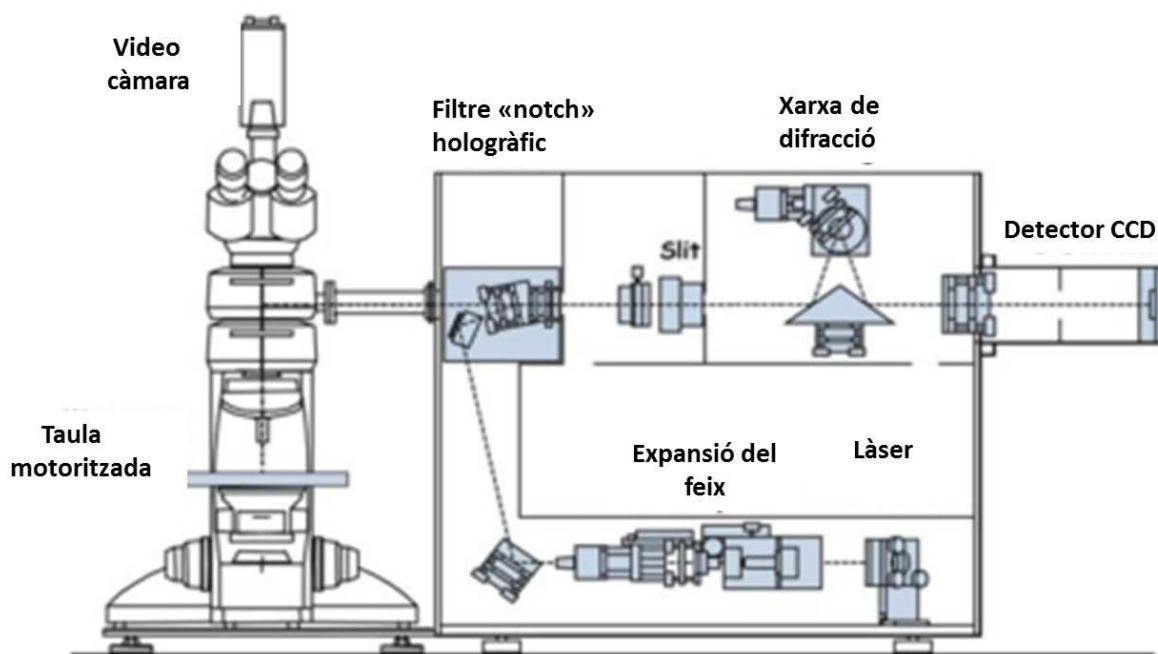


Figura 2.3.2.1 Esquema d'un sistema d'imatges de dispersió Raman

La microscòpia Raman, i en particular, la microscòpia confocal, presenten una resolució espacial molt elevada, ja que posseeix una òptica que incrementa el contrast de les imatges. El disseny d'un microscopi confocal es basa en l'ús d'un *pinhole* (colimador d'orifici delimitat) situat davant del detector, que permet eliminar el senyal fluorescent provinent de la mostra que es troba fora del pla focal.

La figura 2.3.2.2 mostra l'esquema de l'òptica d'un microscopi confocal, on s'observa que la llum provinent de sobre o de sota del pla focal (ratlles discontinües negres) no pot travessar el *pinhole* i, per tant, no arriba al detector. En canvi, la llum provinent del pla focal (ratlla vermella) convergeix en el *pinhole* i arriba al detector.

Avui en dia, la majoria de microscopis Raman empenen aquesta tècnica òptica, ja que permet de manera no destructiva l'adquisició d'imatges de seccions òptiques a diferents profunditats de la mostra. Aquestes seccions són utilitzades per a realitzar anàlisis tridimensionals de la mostra o per estudiar parts internes de la mostra a les profunditats d'interès. La capacitat de penetració del làser i la qualitat del senyal detectat depenen de les propietats del material analitzat. El microscopi pot incloure objectius de diferents augments (5x,10x,50x,100x), objectius de llarga distància focal i objectius d'immersió. Els objectius d'immersió requereixen d'un medi d'immersió que omple l'espai entre la mostra i l'objectiu amb un índex de refracció proper al del vidre. Els objectius d'immersió milloren la resolució de la imatge. Els líquids d'immersió més comuns són l'oli, l'aigua i el glicerol.

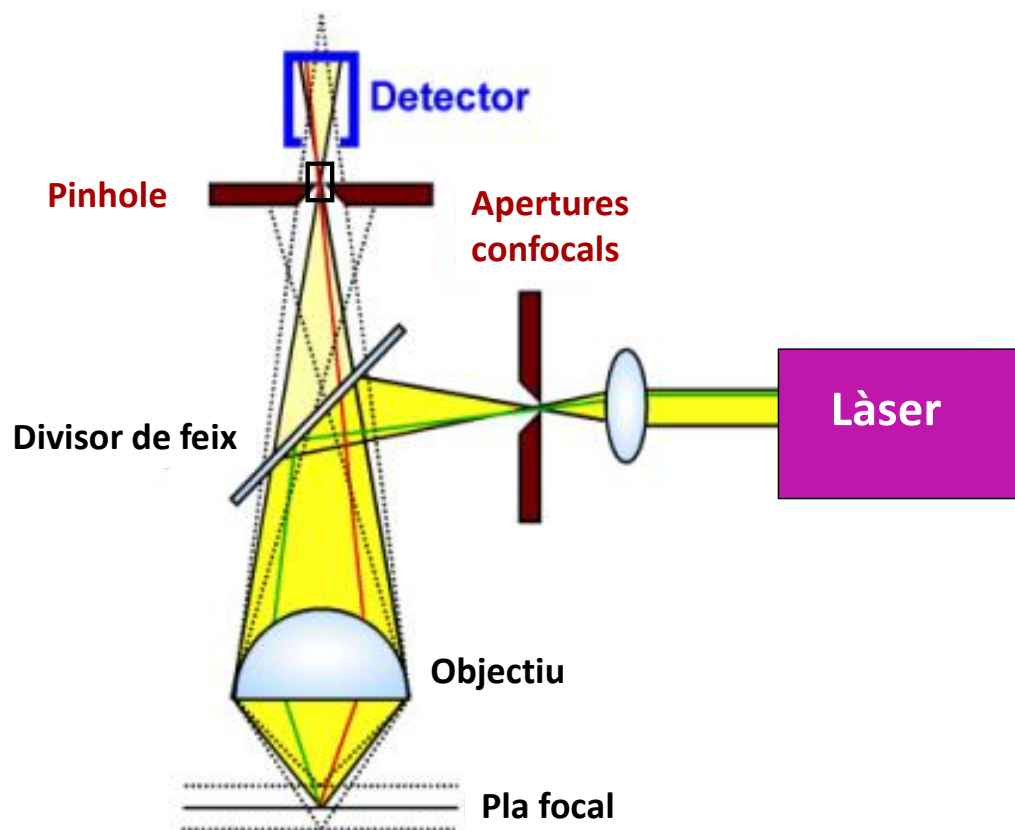


Figura 2.3.2.2 Esquema de l'òptica d'un microscopi confocal

Escala de la imatge , modes d'adquisició

Fins fa relativament poc, l'ús dels sistemes d'adquisició Raman es veia limitat al món microscòpic. A causa del continu avenç tecnològic en l'àmbit de les altes emissions d'energia dels làsers en estat sòlid (sondes), es poden obtenir imatges Raman a escala macroscòpica.

Altres sistemes d'adquisició d'imatges Raman empren accessoris per tal d'aconseguir escanejar superfícies de mostra més grans. Per exemple, el sistema d'imatges Raman LabRam de la companyia Horiba Yvon presenta un nou mode d'adquisició d'imatges, anomenat Duoscan, que es basa en una combinació de miralls de rastreig que mouen el feix del làser per a escanejar una àrea de píxel més gran. Aquest nou sistema làser d'escaneig permet adquirir imatges amb una mida de píxel de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$.

Els modes de registre més comuns en els sistemes d'adquisició d'imatges Raman són el *point* i el *line scanning*. El mode *point scanning* presenta una elevada sensibilitat i resolució espacial, però per contra aquest tipus d'imatges requereixen un llarg temps d'adquisició, del ordre de 1-10s per píxel (o més). El mode *line scanning* redueix dràsticament el temps d'anàlisi, fins a menys de 5 ms per píxel i permet la mesura d'àrees més grans i d'imatges completes en un interval de temps de segons o minuts ⁶⁵. Instrumentalment, aquest mode d'adquisició empra una lent cilíndrica o Powell (combinació d'una lent cilíndrica i un prisma) que distribueix el feix del làser en una sola direcció formant una línia sobre la mostra.

Recentment la companyia WITEC ha tret al mercat un nou sistema d'alta velocitat d'adquisició d'imatges Raman (Alpha 300R) que treballa en mode *point scanning* en continu. El temps d'adquisició per a cada espectre és de milisegons; per tant, una imatge pot ser registrada en qüestió de minuts. El temps d'adquisició es redueix notablement en comparació amb el mode *point scanning* tradicional.

2.3.3 Sistema d'adquisició d'imatges de fluorescència

Components instrumentals

Un sistema d'adquisició d'imatges de fluorescència està format per una font d'il·luminació, un microscopi, un filtre òptic, un dispositiu de dispersió i un detector (vegeu figura 2.3.3.1) ⁶⁶.

Hi ha una ampla varietat de fonts de radiació disponibles per als sistemes de fluorescència, com ara làmpades de descàrrega o d'incandescència halògena (tungstè i xenó), díodes emissors de llum (LED), o qualsevol sistema làser, incloent de gas, vidre, i els làsers de díode ⁶⁷. Les làmpades emeten radiació en un interval ampli de longituds d'ona, però presenten variacions d'intensitat durant el temps d'adquisició d'una imatge. En canvi, els LEDs i els làsers de díode (LD) són molt més estables i ideals per a obtenir l'energia en una determinada longitud d'ona. Per tal d'excitar fluoròfors amb diferents longituds d'ona d'excitació, els sistemes s'equipen amb múltiples dispositius de díodes ^{68,69}.

El microscopi de fluorescència presenta diversos objectius visibles (10x, 40x, 60x) i objectius d'immersió (d'oli, aigua i glicerol). El microscopi de fluorescència també pot presentar una òptica confocal, que permet obtenir imatges de fluorescència d'alt contrast a diferents profunditats.

Els filtres són els responsables de deixar passar la llum a les longituds d'ona d'excitació específiques i bloquejar les longituds d'ona no desitjades. Una vegada filtrades, la llum incideix sobre la mostra per reflexió d'un mirall dicroic i novament es filtra la intensitat de fluorescència emesa a les longituds d'ona desitjades a través d'un filtre sintonizable optoacústic (AOTF) i finalment s'envia al detector.

Hi ha una gamma àmplia de detectors disponibles, com són els dispositius de càrrega acoblada (CCD), dispositius multiplicadors d'electrons de càrrega acoblada (EMCCD), fotodíodes d'allau (APD) i tubs fotomultiplicadors (PMT). Els CCD són els més comunament emprats, ja que són de baix cost i molt sensibles i poden detectar simultàniament senyals fluorescents i bioluminescents

⁶⁷ .

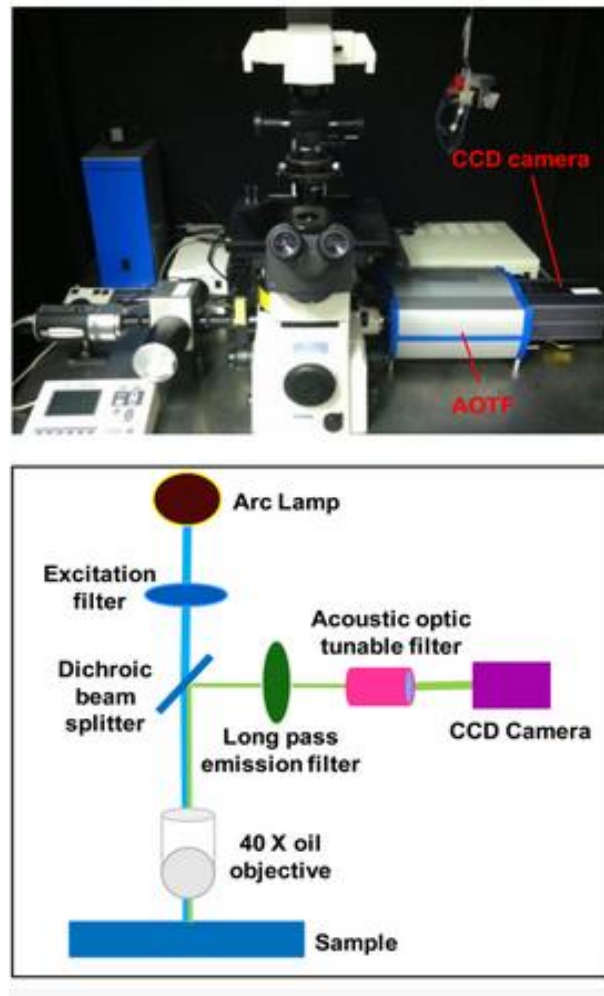


Figura 2.3.3.1 Fotografia i esquema de l'òptica d'un microscopi de fluorescència

Escala de la imatge i modes d'adquisició

La microscòpia de fluorescència presenta una elevada resolució espacial, fet que resulta molt atractiu dins el camp de la medicina, ja que la majoria de components cel·lulars i moleculars involucrats en el diagnòstic clínic o en el descobriment de nous fàrmacs són fluorescents o bé poden ser identificats mitjançant l'ús de biomarcadors fluorescents^{39,68–71}. L'òptica confocal és capaç d'obtenir imatges d'elevada qualitat a diferents profunditats de la mostra, la qual cosa permet la visualització d'imatges de cèl·lules i teixits en 3D.

Una altra de les principals aplicacions de la microscòpia confocal és l'estudi de mostres *in vivo* (com cèl·lules i teixits animals i vegetals, embrions d'insectes, algues...etc) durant una seqüència

temporal. D'aquesta forma es pot seguir el comportament d'un sistema o estructura biològica, al qual se li ha aplicat algun tipus de tractament al llarg del temps. A escala macroscòpica els estudis *in vivo* se segueixen mitjançant l'ús de sondes selectives de fluorescència. A escala macroscòpica els sistemes poden adaptar estudis ja realitzats *in vitro* a *in vivo*. Això resulta molt beneficiós per al diagnòstic de malalties, avaluació de la resposta del teixit davant un agent terapèutic o durant una intervenció quirúrgica a temps real ^{72,73}.

En microscòpia de fluorescència, els tres modes de treball *point scanning*, *line scanning* i *focal plane scanning* són possibles ¹³. El mode de treball *focal plane scanning* és el més emprat en biologia molecular, ja que permet l'adquisició d'imatges a longituds d'ona d'excitació específiques dels fluoròfors de cèl·lules i teixis en qüestió de segons. El mode *focal plane scanning* és capaç d'escanejar la mostra a diferents longituds d'excitació, de forma que es poden observar simultàniament diferents estructures dins d'una mateixa mostra i estudiar la colocalització dels diferents fluoròfors. Per altra banda, el *line scanning* és el mode de treball emprat en la majoria d'anàlisis de fluorescència a escala industrial, atès que es poden adquirir imatges en continu i on-line. En aquest cas, igual que en els sistemes Raman, una lent cilíndrica és col·loca davant de la font d'excitació del làser per a reduir el gruix de la línia ⁶⁹.

2.3.4 Sistema d'adquisició d'imatges d'espectrometria de masses

Components instrumentals

Les imatges d'espectrometria de masses (MSI) es basen en la visualització de la composició molecular i atòmica de materials orgànics i inorgànics en superfícies complexes. Com no es tracta d'una tècnica espectroscòpica, presenta diferències instrumentals pel que fa al mode d'adquisició.

El sistema d'adquisició de MSI necessita d'un espectròmetre de masses equipat amb una plataforma mòbil capaç de moure la mostra en les coordenades d'un pla específic (x i y) i acoblat, o bé a unes microsondes o a un microscopi amb un accessori capaç d'ionitzar les molècules presents en la mostra.

Els sistemes d'adquisició s'han adaptat a diferents tipus d'espectròmetres de masses i mètodes d'ionització. Hi ha tres mètodes d'ionització que són els més emprats actualment en la majoria d'aplicacions: Espectrometria de masses d'ions secundaris (SIMS), desorció/ionització assistida per matriu mitjançant làser (MALDI) i ionització per desorció amb electroesprai (DESI) (vegeu figura 2.2.4.1)⁷⁴.

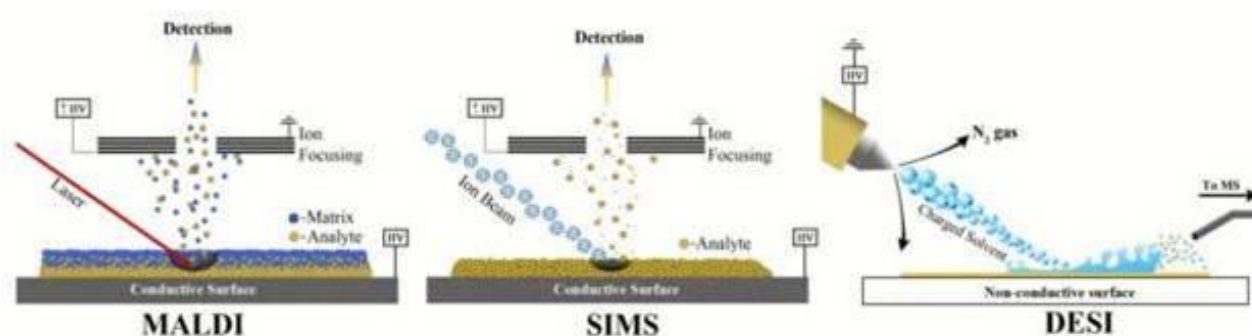


Figura 2.3.4.1 Representació dels mecanismes d'ionització MALDI, SIMS i DESI

Quan s'utilitza la font d'ionització MALDI, la mostra es mescla amb una matriu orgànica en excés i es disposa sobre una superfície conductora de metall. La mostra és irradiada amb un làser de radiació polsada en condicions d'alt buit en la regió de l'Ultraviolat-Visible o infraroig. La font d'il·luminació provoca que part de la matriu absorbeixi energia i que aquesta es converteixi en energia d'excitació i en transferència de protons a la mostra (ionització). La capacitat de la matriu orgànica per augmentar dràsticament l'eficiència d'ionització dels compostos requereix una menor potència del làser, cosa que el converteix en un mecanisme suau d'ionització capaç d'analitzar compostos d'alt pes molecular, com proteïnes i pèptids⁷⁵⁻⁷⁸, lípids^{79,80}, i d'analitzar medicaments administrats i els seus respectius metabòlits. Per contra, aquest tipus d'imatges presenten una baixa resolució espacial que fa impossible dur a terme imatges a nivell cel·lular.

En el mecanisme d'ionització SIMS, la mostra es col·loca sobre una superfície conductora que és bombardejada per una font d'ions primaris (per exemple Ar^+ , Ga^+ , In^+)⁸¹. Els ions primaris penetren i indueixen col·lisions en cascada amb els àtoms i molècules que es troben en la superfície de la mostra. El procés de dispersió produeix ions secundaris, els quals són analitzats

en el detector ⁸². L'ús d'un feix d'ions primari permet que les imatges presentin una elevada resolució espacial (mida de píxels fins a $1 \times 1 \text{ nm}^2$), perquè només un petit percentatge de molècules de la superfície de la mostra es troba ionitzat. L'ús d'altres fonts primàries d'ionització, com Au^{3+} , augmenta l'interval de detecció de masses ^{83,84}. L'absència de la matriu orgànica en aquest tipus de tècnica permet la formació d'imatges de petits ions com el Na^+ , K^+ , i fins i tot H^+ ⁷⁴.

L'últim dels tres mètodes d'ionització és la desorció amb electrosprai. L'electrosprai dirigeix un núvol de petites gotes de dissolvent altament carregades a la superfície de la mostra. L'impacte de les gotes amb la superfície de la mostra genera gotes secundàries carregades amb molècules de la superfície de la mostra dissoltes. Conforme el dissolvent s'evapora, les molècules d'anàlit s'aproximen, es repel·leixen i finalment, quan la repulsió de les càrregues positives venç la tensió superficial, les gotes esclaten. El procés es repeteix fins que l'anàlit es troba lliure de dissolvent, de manera que tan sols queden ions que es mouen cap a l'analitzador de masses. Aquest mètode d'ionització presenta menor sensibilitat i resolució espacial comparat amb la resta de fonts d'ionització (SIMS o MALDI), però a la vegada és l'únic que permet analitzar cert tipus particulars de mostres. Per exemple, es poden adquirir imatges de bacteris i plantes mitjançant la font DESI, ja que és possible l'anàlisi de mostres humides. També és possible el seguiment de processos, ja que un producte químic que reacciona amb un compost d'interès pot afegir-se al dissolvent de l'aerosol i controlar el producte de la reacció.

Escala de la imatge i modes d'adquisició

El mode de registre més comú per a l'adquisició de MSI és el mode *point scanning* (vegeu figura 2.3.4.2a). Recentment, el mode *point scanning* en continu s'ha introduït com un mode de treball en el MSI, on el temps d'anàlisi es redueix significativament ⁸⁵. També s'han dissenyat làsers que tenen la capacitat de treballar de manera contínua i escanejar línees de píxels simultàniament sobre la superfície de la mostra. Instrumentalment, el mode de treball *line scanning* empra làsers Nd:YLF i/o Nd:YVO_4 de llum polsada amb freqüències de repetició $> 1 \text{ kHz}$ i amb cicles de vida més llarg que els làsers de N_2 ⁸⁶.

Per altra banda, l'ús de microscopis d'ions permet projectar la posició espacial dels ions generats en la superfície de la mostra sobre un detector sensible a la posició (vegeu figura 2.3.4.2b). Un microscopi d'ions es troba format per una font d'ions, lents electrostàtiques que enfoquen les partícules carregades de manera anàloga a les lents òptiques, un sistema de buit i un detector bidimensional, com per exemple, un CCD. La informació espacial s'obté a partir de l'àrea ionitzada i és, per tant, independent del diàmetre del feix ionitzant. L'àrea de la imatge ve determinada per l'augment del microscopi, la qualitat de l'òptica d'ions i la resolució del detector sensible a la posició. Aquest fet permet l'anàlisi d'àrees de mostra més grans sense la necessitat de moure la mostra^{87,88}. Aquest mode de treball és l'equivalent al mode *focal plane scanning* però en lloc de recollir imatges completes a diferent longituds d'ona, es recullen imatges a diferents relacions m/z .

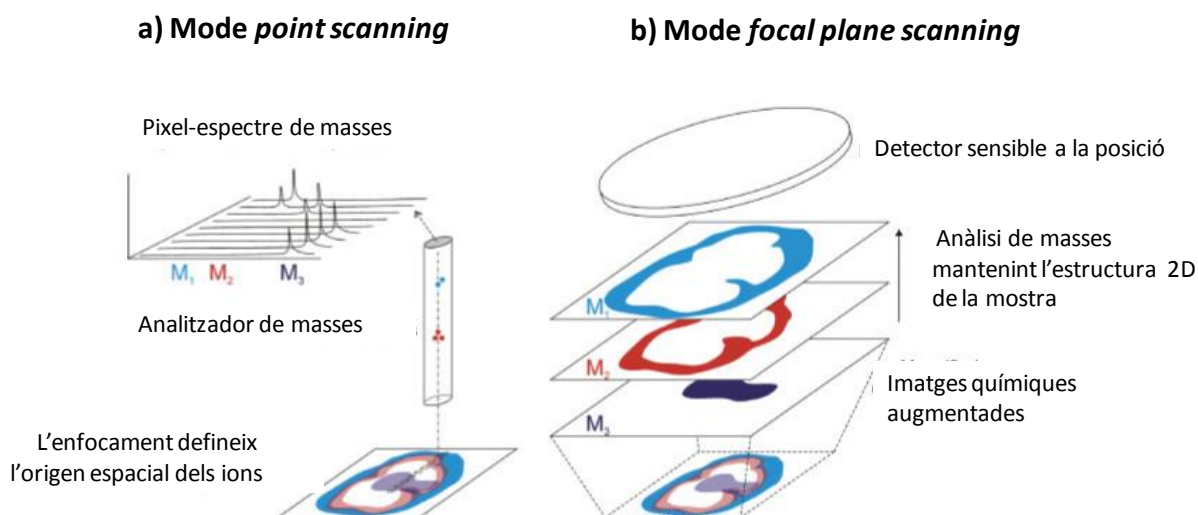


Figura 2.3.4.2 Il·lustració dels diferents modes d'adquisició espacial d'imatges d'espectrometria de masses. **a)** Mode *point scanning*. Registra una per una els espectres de masses d'una varietat de posicions designades per construir una imatge molecular. **b)** Mode *focal plane scanning*, usant un microscopi d'ions-òptic es registren amb un detector 2D imatges de distribucions de masses d'ions ampliades.

2.3.5 Comparació entre els diferents sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals

A mode d'esquema comparatiu, la taula 2.3.5.1 mostra els principals paràmetres dels diferents sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals. Com ja s'ha anat explicant durant d'aquesta secció cal destacar que els sistemes Raman presenten una elevada resolució espectral i espacial respecte els sistemes d'adquisició NIR i FT-IR, tot i que per als sistemes FT-IR acoblats a una línia de radiació d'excitació de Sincrotró, la resolució espacial augmenta significativament i arriba a mides de píxel per sota de 1µm.

Tant els sistemes d'imatges NIR com FT-IR presenten menor resolució espacial, però són mètodes adequats per a l'anàlisi de mostres de dimensions més grans en un temps d'anàlisi relativament curt. Gràcies al continu desenvolupament tecnològic, els sistemes FT-IR són aparells molt complets que permeten l'adquisició d'imatges en tota la regió de l'infraroig de mostres microscòpiques i macroscòpiques. Un altre tret important és el mode de treball de pla focal que permet l'adquisició de les imatges en un temps molt curt. El sistemes FT-IR també presenten l'opció d'accessoris com l'ATR que permet l'anàlisi de tot tipus de mostres amb un mínim pretractament.

Per altra banda, els sistemes de fluorescència i d'espectrometria de masses presenten la capacitat d'analitzar i caracteritzar molècules molt petites. Fet d'especial interès, com ja es veurà en el següent apartat, en l'àmbit mèdic atès el gran nombre de metabòlits que es veuen implicats en el diagnòstic clínic i en el desenvolupament de nous fàrmacs.

Les imatges MSI tenen una elevada resolució de canals m/z , que proporciona una gran informació detallada sobre la composició química de la mostra. Per contra, estan lligades a una tècnica destructiva, la qual cosa complica l'anàlisi *in vivo*. En canvi, els sistemes d'adquisició d'imatges fluorescents no són destructius i són capaços d'enregistrar imatges d'àrees més grans, però moltes vegades són necessaris agents fluorescents per arribar a descriure de manera completa els components d'interès químic i biològic de la mostra.

Cal encara un desenvolupament tecnològic per a la millora dels sistemes d'adquisició d'imatges, però és important fer notar que aquests sistemes han estat i són una gran revolució dins de l'àmbit analític, mèdic, biològic i industrial. Cal destacar que la necessària evolució tecnològica va íntimament lligada al desenvolupament d'eines d'anàlisi de dades que permetin la interpretació final de la mesura.

Taula 2.3.5.1 Paràmetres instrumentals dels diferents sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals: Raman, FT-IR, NIR, Fluorescència i IMS.

	Àrees de píxel		Modes d'adquisició				
Sistema	Escala microscòpica (mida mínima)	Escala macroscòpica (mida màxima)	<i>Point scanning</i>	<i>Line scanning</i>	<i>Focal plane array</i>	Interval de mesura	Resolució espectral (màxima)
Raman	$< 0.5 \times 0.5 \mu\text{m}^2$	$500 \times 500 \mu\text{m}^2$	✓	✓	×	$100-4450 \text{ cm}^{-1}$	$0,4 \text{ cm}^{-1}$
FT-IR	$< 1 \mu\text{m}^2$ (Radiació Sincrotró)	$1000 \times 1000 \text{m}^2$ (Sensor remot)	✓	✓	✓	$50000-10 \text{ cm}^{-1}$	4 cm^{-1}
NIR	$10 \times 10 \mu\text{m}^2$	$1000 \times 1000 \text{m}^2$ (Sensor remot)	✓	✓	✓	$12500-4350 \text{ cm}^{-1}$	5 cm^{-1}
Fluorescència	$100 \times 100 \text{ nm}^2$	$1000 \times 1000 \text{m}^2$ (Sensor remot)	✓	✓	✓	400-1000 nm	2 nm
MSI	$200 \times 200 \text{ nm}^2$	$200 \times 200 \mu\text{m}^2$	✓	✓	✓	0-500000 (m/z)	R=20000

2.4 APLICACIONS I USOS

El desenvolupament de les imatges hiperespectrals ha despertat un gran interès, ja que la informació de les imatges hiperespectrals és molt valuosa per al control i la millora de processos, l'estudi de superfícies, àrees i textures i el coneixement de la composició i la distribució dels constituents químics de les mostres. El gran potencial d'aquest tipus de mesura permet trobar-ne molts usos en la indústria farmacèutica ⁵⁴, l'estudi de polímers, la ciència de materials, el camp agroalimentari, els estudis biomèdics, clínics i de diagnòstic, així com en la gestió i la planificació de recursos naturals i mediambientals.

2.4.1 Aplicacions biomèdiques i biològiques

Un dels camps on més ha incidit el desenvolupament de les imatges hiperespectrals ha estat el biomèdic, on hi ha una àmplia gamma d'aplicacions que van des de la biologia molecular fins al diagnòstic clínic. En l'actualitat, aquest camp es troba en plena revolució gràcies a la cooperació interdisciplinària de físics, biòlegs, enginyers, metges, patòlegs... Tant el món acadèmic com el de la indústria ha destinat importants recursos per a avançar en aquest camp ⁸⁹.

En un principi, degut al ràpid avenç tecnològic, l'espectroscòpia clàssica FT-IR i Raman es van convertir en eines complementàries per a l'avaluació dels teixits i cèl·lules, ja que podien enregistrar molta informació sobre la composició bioquímica i estructura molecular de la mostra. Les espectroscòpies vibracionals van permetre detectar canvis químics moleculars relacionats amb diferents estats patològics sense la necessitat d'emprar mètodes de tinció ni de marcatge histoquímic ^{62,90}. Tot i així, no es tenia en consideració l'heterogeneïtat dels teixits, de manera que tan sols es podien comparar espectres de zones homogènies del teixit amb les dades obtingudes a partir de protocols tradicionals.

Les imatges hiperespectrals FT-IR i Raman proporcionen més informació sobre la distribució espectral i espacial de les espècies bioquímiques i poden ser directament comparades amb les imatges òptiques obtingudes a partir de protocols histoquímics. La informació adquirida és contrastada i les variacions espectrals, degudes a les diferents classes de teixits o a la presència

de teixits alterats, són identificades. La variació espectral entre els diferents tipus de teixits i els diferents estats patològics és molt petita; per això, el desenvolupament d'adaptació d'eines d'anàlisi multivariant per a l'exploració de les dades ha estat clau per a l'estudi i interpretació de les imatges bioquímiques ^{91,92}.

En la bibliografia es troben estudis diversos sobre l'anàlisi de teixits i cèl·lules mitjançant sistemes d'imatges Raman i FT-IR, com per exemple la determinació de problemes ossis ⁹³, identificació de diferents tipus de teixit intestinal ⁹⁴, detecció de càncer en teixit mamari ⁹⁵⁻⁹⁹, detecció de displàsia i canvis precancerosos al coll uterí ^{100,101}, detecció de melanomes ¹⁰² i limfomes ¹⁰³ etc...

Tant referències bibliogràfiques de treballs de recerca com un recent treball de revisió ⁶² demostren que hi ha més estudis biomèdics mitjançant l'ús d'imatges FT-IR que mitjançant l'ús d'imatges Raman. Això és degut al desenvolupament de nous sistemes d'imatges FT-IR que permeten obtenir imatges d'elevada qualitat en qüestió de minuts, i a la introducció de l'ús de la radiació d'excitació de sincrotró, que proporciona imatges d'elevada resolució espacial de gran interès en aplicacions biomèdiques i de radioteràpia. El fet d'obtenir imatges FT-IR d'alta qualitat de manera molt ràpida i d'alta qualitat converteix aquesta tècnica en una eina complementària per a l'avaluació diagnòstica de teixits i cèl·lules.

El temps d'adquisició de les imatges Raman és molt llarg i el senyal adquirit és molt dèbil. Per contra, les imatges Raman presenten millor resolució espacial, major sensibilitat, especificitat molecular i el senyal de l'aigua no interfereix tan fortament com en les imatges FT-IR. Per aquesta raó, la microscòpia Raman és més emprada en l'estudi dels components biològics d'una única cèl·lula, ja que molts dels orgànuls cel·lulars que es troben implicats en vies metabòliques són de menys d'1 µm de diàmetre. L'estudi i anàlisi d'aquestes estructures és de gran interès, ja que les seves anomalies indueixen malalties que acaben afectant els teixits. La microscòpia FT-IR tan sols permet detectar els compartiments més grans de la cèl·lula, com el nucli, el citoplasma i la membrana, atès el seu límit de difracció ¹⁰⁴.

En la figura 2.4.1.1 es pot observar una imatge Raman d'una única cèl·lula HeLa (cèl·lula epitelial humana procedent d'un carcinoma cervical). A l'esquerra de la figura s'observa la imatge en escala de grisos de la cèl·lula en medi aquós, seguida del mapa de segmentació de la imatge

Raman de la cèl·lula, que representa en colors diferents zones de la mostra amb espectres Raman diferenciats (i, per tant, amb composició química i comportament diferent) i a la dreta la imatge de fluorescència de la cèl·lula després de la tinció. En el mapa de segmentació es demostra com la microscòpia Raman pot distingir entre signatures espectrals corresponents al nucli (classe gris) i al nuclèol (classe blava). També es pot estudiar la distribució dels mitocondris (classe verd fosc) al voltant la regió perinuclear (classe verda) i distingir entre els agregats i túbuls de mitocondris, que són els responsables d'alteracions bioquímiques. La detecció d'aquests canvis sense la necessitat de tinció és de rellevant importància per al diagnòstic mèdic.

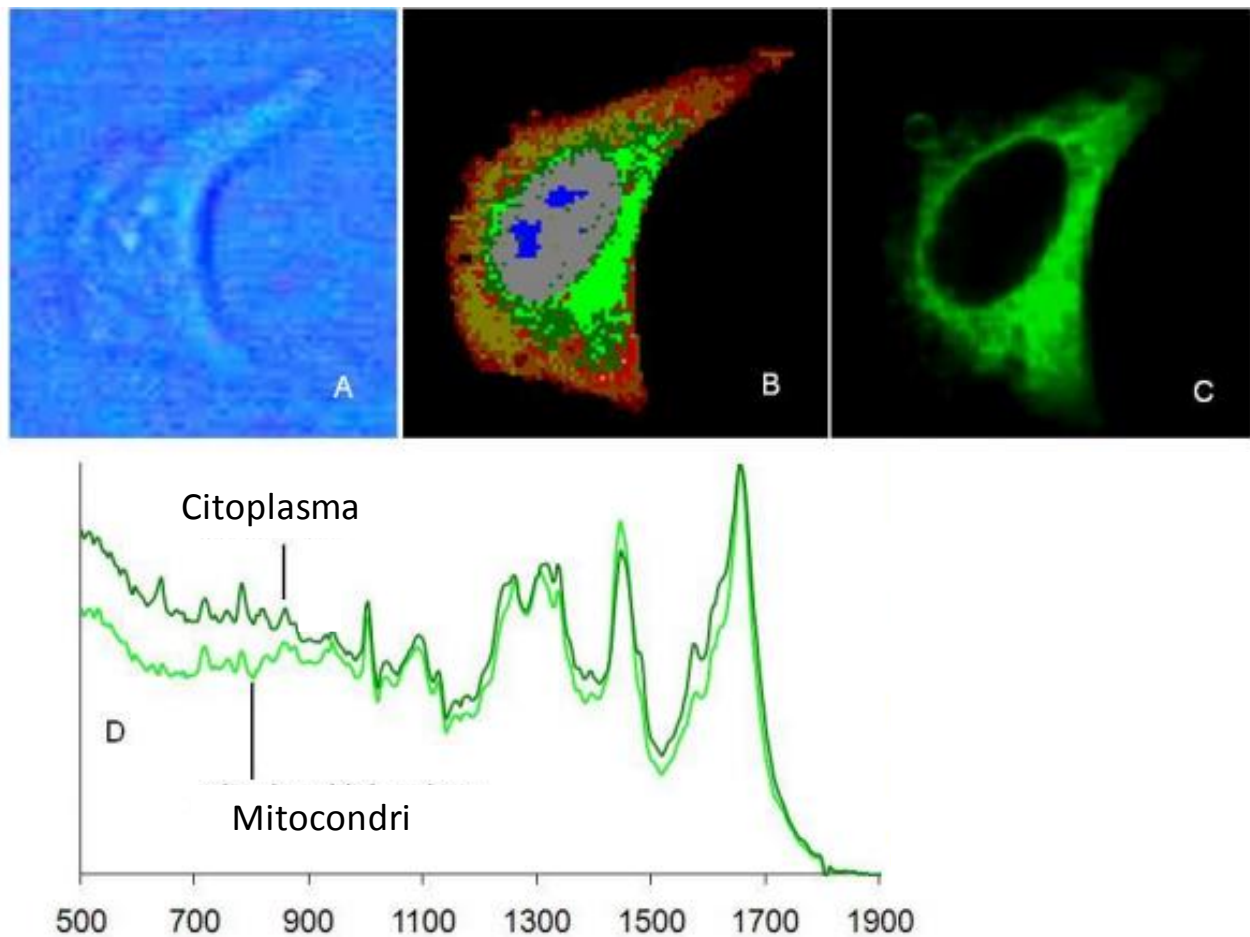


Figura 2.4.1.1 a) Imatge d'escala de grisos d'una cèl·lula HeLa. b) Mapa de segmentació de la imatge Raman de la cèl·lula HeLa. c) Imatge de fluorescència després de la tinció de la cèl·lula. d) Espectres mitjans de la regió del citoplasma i els mitocondris.

El diagnòstic *in vivo* és essencial en la medicina, ja que permet prendre decisions *in situ* durant intervencions quirúrgiques, com per exemple determinar els límits d'excisió del teixit afectat, dur a terme el seguiment de la teràpia aplicada al pacient i personalitzar-ne el tractament mèdic, etcètera... Les aplicacions *in vivo* obren moltes vies d'estudi en el diagnòstic clínic, ja que permeten la caracterització de la composició molecular i la visualització del teixit de manera immediata i efectiva ⁶². Les imatges Raman i FT-IR es poden obtenir *ex-vivo* i gràcies al desenvolupament de sondes de fibra òptica es poden obtenir també *in vivo*.

Les imatges de fluorescència reben una atenció especial en l'anàlisi *in vivo* de teixits i cèl·lules. Molts marcadors bioquímics emeten fluorescència i els que no ho fan poden ser marcats sovint amb substàncies que poden ser detectades mitjançant fluorescència ^{72,105}. El desenvolupament de sondes de fluorescència que emeten en la regió de l'infraroig proper, on els teixits presenten poca autoabsorció de la fluorescència, permet observar la superfície fluorescent del teixit i aprofundir fins uns quants centímetres en la seva observació ⁶⁸. La majoria de les aplicacions d'imatges de fluorescència *in vivo* estan relacionades amb estudis oncològics orientats a la detecció de tumors malignes, l'anàlisi del grau de propagació dels tumors i l'estudi del tractament per als tumors localitzats ¹⁰⁶.

En la figura 2.4.1.2 es mostra un exemple d'imatge de fluorescència *in vivo* d'una rata a la qual se li ha induït un fibrosarcoma a la part superior del tòrax. A la dreta es mostra la imatge de fluorescència mitjançant l'ús d'una sonda selectiva de catepsina B. La figura 2.4.1.2b és la imatge de la rata amb la seva lluminositat intrínseca sense la utilització de cap filtre de fluorescència i la figura 2.4.1.2c és la superposició de la imatge 2.4.1.2a i de la imatge 2.4.1.2.b per a millorar la visualització del tumor induït.

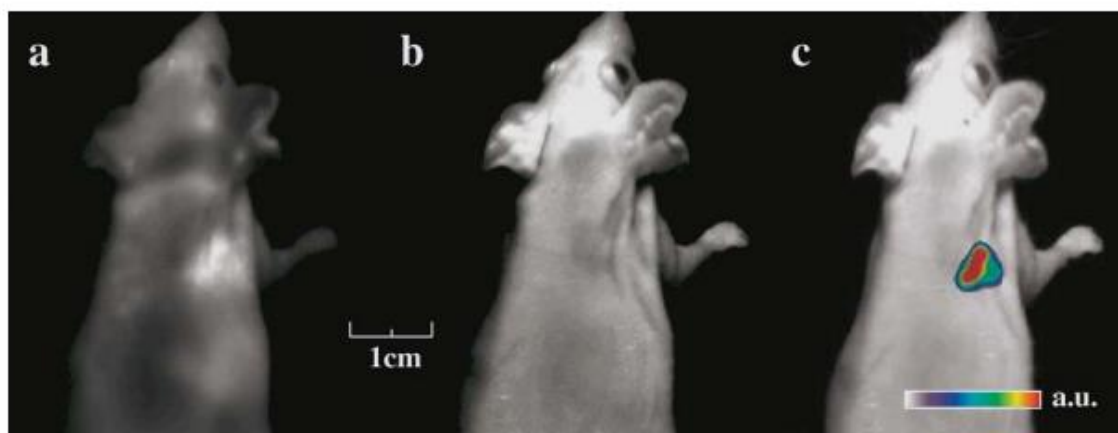


Figura 2.4.1.2 Exemple d'una imatge típica de fluorescència in vivo. **a)** Imatge de fluorescència d'una rata amb un carcinoma HT1080 injectat en la part superior del tòrax mitjançant l'ús d'una sonda selectiva de catepsina B. **b)** Imatge de la rata amb la seva lluminositat intrínseca sense l'ús de cap filtre fluorescent. **c)** La superposició de la imatge **a)** i **b)** millora el resultat visual.

El darrer avenç en el camp biomèdic va lligat a l'aparició de les imatges d'espectrometria de masses (MSI). La combinació de l'anàlisi de massa molecular i la informació espacial permet la visualització de molècules en superfícies complexes ⁷⁴. Aquests sistemes presenten una alta sensibilitat, que permet la identificació i quantificació de molècules juntament amb els seus metabòlits en mostres biològiques en el teixit. Això ha permès noves aplicacions com el descobriment de biomarcadors ¹⁰⁷, l'estudi del perfil metabòlic de fàrmacs ¹⁰⁸, l'anàlisi de lípids ¹⁰⁹, pèptids i proteïnes ^{76,77,79,110} en mostres biològiques. La capacitat d'aquests sistemes d'analitzar la distribució de centenars de molècules en la mostra biològica sense la necessitat de la utilització d'anticossos ni biomarcadors tumorals ha estat una revolució dins de l'àmbit biològic i biomèdic.

La importància de les MSI en la recerca biomèdica durà a investigacions orientades al desenvolupament de sistemes que no destrueixin la mostra i així poder fer seguiment de sistemes cel·lulars *in vivo*, on es podran adquirir imatges a diferents temps sobre la mateixa mostra. Posteriorment, aquestes dades podrien ser utilitzades per generar vídeos moleculars del ritme cardíac de cèl·lules sanes i cancerígenes, estudiar els efectes destructius d'una toxina en les cèl·lules veïnes...

Una de les aplicacions més interessants de les MSI seria la possible substitució de les biòpsies per agulles que aspiressin i analitzessin les molècules del teixit a diagnosticar. És un dels projectes de recerca més recents, on els sistemes estarien equipats amb sondes que presentarien una agulla al seu extrem compartimentada en petits punts de mostreig. La idea és inserir l'agulla en el teixit des de l'exterior del cos de manera que travessi el teixit fins a la zona afectada. Una vegada inserida s'enregistrarien els espectres de masses a cada un dels punts de mostreig en què l'agulla es troba compartimentada ⁷⁴.

Les imatges hiperespectrals són una eina molt prometedora per a l'automatització de l'anàlisi i diagnòstic biomèdic. L'objectiu és el desenvolupament d'un mètode complementari d'anàlisi de la informació automatitzat que permeti l'exploració de teixits i cèl·lules i detecti la presència d'anomalies amb un nivell baix d'incertesa i que eviti la subjectivitat d'exploracions tradicionals.

2.4.2 Aplicacions en el camp agroalimentari i ambiental

Els sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals van sorgir al voltant dels anys 80, amb l'aparició dels sensors remots. Els sensors remots són sistemes d'adquisició de la informació de la superfície terrestre que poden actuar des de diferents tipus de plataformes (terrestres, aèries o satèl·lits) i que funcionen a través de la captura de l'energia relaxada o irradiada per la superfície del planeta. Hi ha sensors passius, que recullen l'energia emesa per la Terra com a conseqüència de la incidència de la llum solar, i sensors actius, que tenen la seva font pròpia d'il·luminació i que poden treballar en la foscor o en condicions de baixa radiació solar. Entre els sensors actius diferenciem el RADAR (RADio Detection And Ranging) i el LIDAR (LIght Detection And Ranging o Laser Illuminated Detection and Ranging). El radar utilitza com a font de radiació ones de ràdio d'alta freqüència i treballa en la regió de l'espectre entre 1mm i 1m. Es basa en la capacitat d'aquestes ones de xocar amb els objectes i ser dispersades. En canvi, el LIDAR és anàleg al Radar però la seva font de radiació és un làser.

Els sensors remots proporcionen fotografies aèries i imatges de satèl·lit. Les dades obtingudes s'empren com a eina en les ciències naturals, en la planificació ambiental i en els estudis de contaminació. El 1972 apareix el primer satèl·lit Landsat. Landsat era capaç d'observar qualsevol

part de la Terra cada 18 dies. L'objectiu inicial va ser fer un seguiment en el temps de les collites de blat de moro i arròs¹¹¹. Seguidament es van desenvolupar satèl·lits amb més canals espectrals i millor resolució espacial, tal i com ja s'ha esmentat en l'apartat 2.1, que van permetre una anàlisi completa de les substàncies majoritàries i minoritàries de la superfície i de les subcapes externes de l'escorça terrestre. Al voltant de l'any 2000, l'ús de sensors multiespectrals va proporcionar informació sobre la vegetació terrestre, que va permetre la comprensió d'alguns processos naturals en el sistema Terra i l'observació de les conseqüències de l'activitat antropogènica. En la figura 2.4.2.1. es poden observar imatges del Landsat en la regió de Matto Grosso, Brasil, recollides en el període 1998-2003. En elles es perceben els canvis que es van produir en una regió forestal degradada pels incendis i la tala d'arbres.

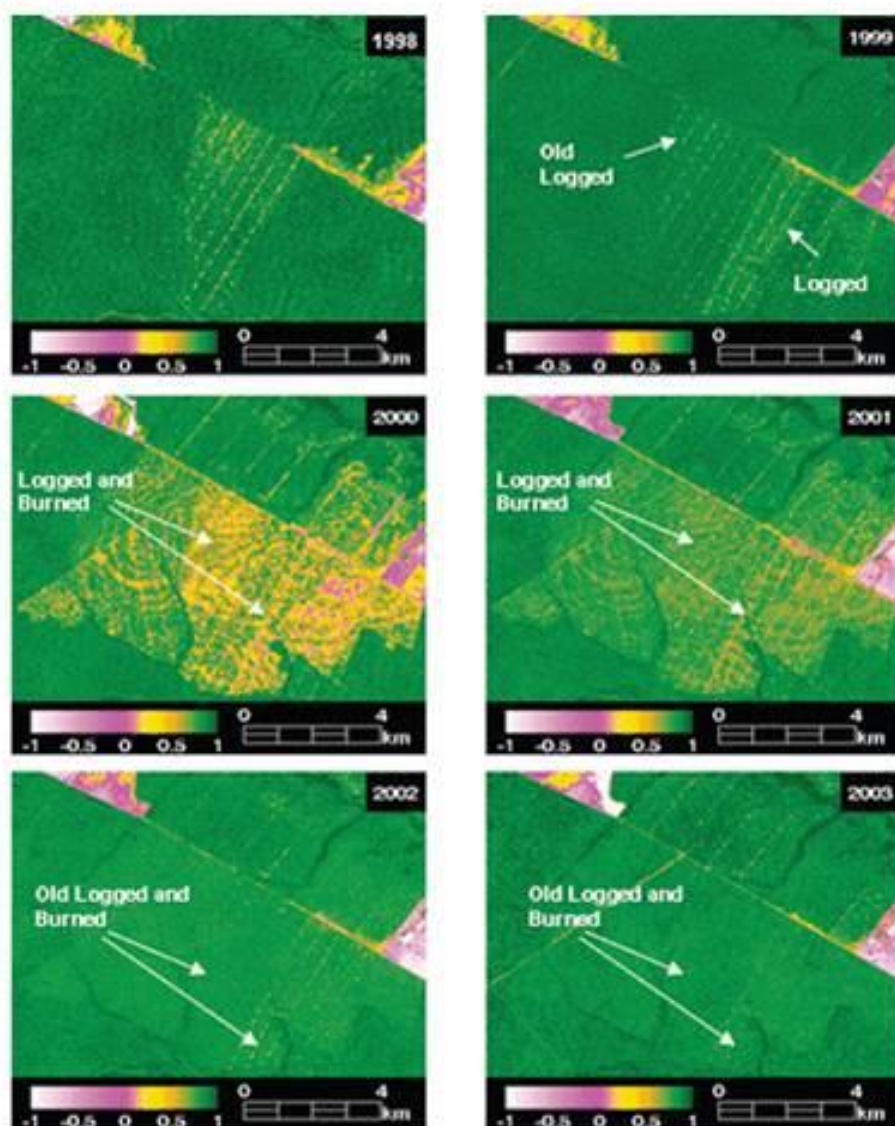


Figura 2.4.2.1 Imatges recollides anualment, durant el període 1998-2003, des del Landsat d'una regió forestal del Matto Grosso, Brasil, degradada pels incendis i tala d'arbres.

Els sensors hiperspectrals poden proporcionar informació més detallada sobre la dinàmica de la vegetació pel que fa a cicles bioquímics i característiques estructurals ^{112,113}. També es poden detectar variacions associades a canvis climàtics o a altres factors, com la presència d'incendis o de plagues, es pot estimar la massa de diversos components, com els constituents biogeoquímics d'un bosc, estudiar l'emmagatzematge d'aigua, la població dins d'un àrea rural i dins d'àrees urbanitzades,... Els sensors remots hiperspectrals són una eina que pot contribuir enormement a l'estudi detallat dels ecosistemes i proporcionar la informació necessària per a una gestió

ambiental més controlada i sostenible ^{114,115}. En general, els sistemes de teledetecció són una eina potent per a la gestió medioambiental ja que proporcionen informació actualitzada i detallada sobre la situació terrestre.

L'ús de satèl·lits també es va aplicar al sector agrícola per a l'avaluació dels recursos naturals, classificació i seguiment dels processos biològics i químics. La informació rebuda dels objectes en la regió de l'infraroig és molt útil per a la determinació del temps de collita, per a l'anàlisi de maduresa i de diferents estats d'estrès vegetal i per a la detecció de malalties en plantes. També resulta útil per al control de la qualitat i de la seguretat dels productes després de la collita, en aspectes com la detecció de defectes, l'estudi de la composició, propietats funcionals, malalties i de la contaminació de les plantes, cereals i fruits secs, verdures i fruites, i productes d'origen animal^{55,116}.

L'interès de les imatges hiperespectrals en la indústria alimentària va començar a partir dels anys 90, quan els sensors d'imatges hiperespectrals portàtils de baix cost van arribar als laboratoris de recerca. Actualment, els sistemes d'imatges NIR són de gran rellevància dins la indústria alimentària i agrícola, ja que són capaços de classificar aliments, estudiar la textura i identificar defectes en la superfície o en el interior dels productes ^{117,118}, determinar l'estat de maduració, detectar contaminants i agents infecciosos, etc. És a dir, els sistemes d'imatge NIR permeten mesurar múltiples paràmetres físics i químics de qualitat de l'aliment, d'una manera ràpida, no destructiva, i a més, són fàcilment adaptables en sistemes de control en mode *on-line* i *off-line*¹⁹.

Per altra banda, l'espectroscòpia de fluorescència, tot i ser una tècnica analítica de menor impacte dins del control alimentari, és particularment útil en la detecció dels canvis que pateixen certs cromòfors per la presència de contaminants exògens, com ara els patògens fecals i epifítics ^{13,119}. Recentment, les imatges hiperespectrals de fluorescència han demostrat ser molt convenients per a la identificació de microorganismes en els productes alimentaris¹²⁰.

Dins dels sectors alimentari i agrícola, la selecció de la instrumentació depèn de si el treball és a escala de laboratori o és treball de camp o a escala industrial. A escala de laboratori es treballa amb una instrumentació d'interval espectral ampli; en canvi, a escala industrial o de camp es dissenyen instruments molt automatitzats amb menor interval espectral però amb major

velocitat d'anàlisi. El disseny de l'instrument va lligat principalment al cost i al tipus d'informació que es vol obtenir.

A escala de laboratori, els sistemes d'imatges NIR són una extensió de la tècnica d'espectroscòpia NIR convencional. S'obté la mateixa informació química, però s'afegeix la dimensió espacial. Els instruments de laboratori estan generalment dirigits al coneixement detallat de la composició del producte i al control de qualitat. Els sistemes d'imatge NIR ofereixen la capacitat d'obtenir mapes dels components químics de les mostres, que resulten molt útils per a la detecció de contaminants i de petits canvis bioquímics, per exemple, en organismes genèticament modificats. A escala de laboratori, els sistemes d'imatges hiperespectrals són molt convenients per a la realització d'estudis preliminars abans que l'anàlisi automatitzada sigui llançada a nivell industrial. Aquests estudis preliminars es basen en l'optimització de la identificació de canvis bioquímics i fisiològics dels productes, on l'objectiu principal és aconseguir un equilibri entre el temps, cost econòmic i efectivitat de l'anàlisi.

Un exemple d'estudi preliminar a escala de laboratori es mostra en la figura 2.4.2.2, on l'objectiu és seleccionar la longitud d'ona i el mètode de mesura més representatiu per a la detecció de defectes i contaminants en la superfície de pomes. En les figures 2.4.2.2b i d es mostren les imatges d'una poma sana mentre que en les figures 2.4.2.2a i c es mostren les imatges d'una poma infectada, amb presència de teixit necròtic. Les imatges de la figura 2.4.2.2a i 2.4.2.2b han estat obtingudes a longituds d'ona de 680 i 800 nm respectivament; en canvi, les imatges de la figura 2.4.2.2c i 2.4.2.2d han estat enregistrades mitjançant fluorescència a longituds d'ona d'emissió 530 i 685 nm. El gràfic sota cada imatge representa la mesura (de reflectància o d'intensitat de fluorescència) de cadascun dels píxels que es troben en la línia discontinua marcada en la imatge. El resultat de l'estudi confirma que el teixit necròtic és visible en les mesures de reflectància a la longitud d'ona de 680 nm, mentre que la infecció és visible en ambdues longituds d'ona. Respecte a les mesures de fluorescència, a 530 nm, tant el teixit necròtic com la infecció són detectades amb majors contrast que a les imatges de reflectància ²⁴.

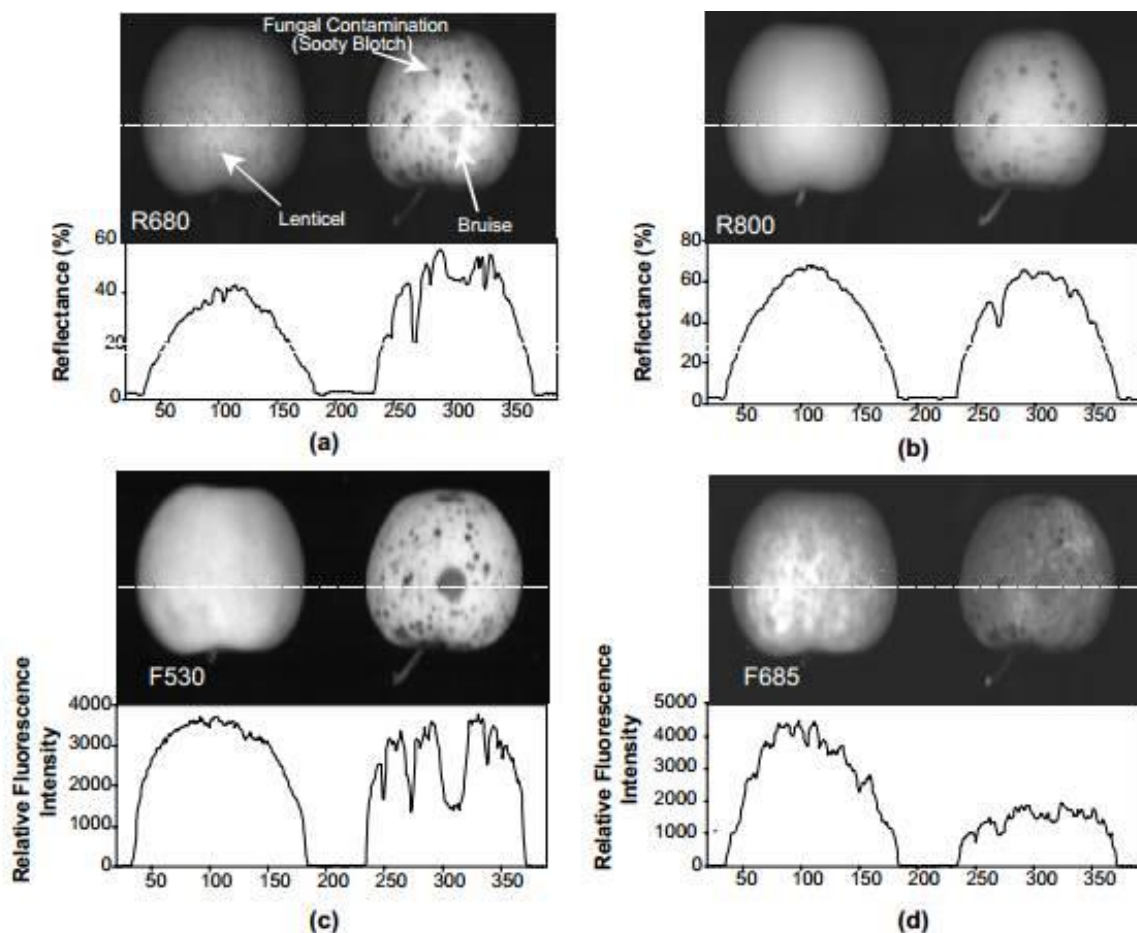


Figura 2.4.2.2 Imatges d'una poma sana i una poma infectada amb presència de teixit necròtic. **a)** Mode de reflectància a 680 nm **b)** mode de reflectància a 800 nm **c)** mode de fluorescència a 530 nm **d)** mode de fluorescència a 685 nm.

A escala industrial, els sistemes d'imatges NIR van aparèixer com una extensió dels sistemes de control de visió per imatge per a substituir dispositius clàssics basats en les imatges RGB. Aquests sistemes impliquen una gran revolució dins el mercat alimentari, ja que són sistemes capaços d'analitzar l'heterogeneïtat de les mostres, tret de gran rellevància per a l'anàlisi de defectes, i la presència de contaminants i agents infecciosos, que prèviament resultaven menys visibles en imatges RGB. D'aquesta manera, les imatges hiperespectrals són una tècnica emergent dins de la indústria alimentaria, on constantment hi ha una demanda per a la millora de la qualitat del producte per part dels consumidors. Un exemple d'aplicació d'imatge NIR a escala industrial és la determinació del contingut d'aigua en bacallà, mitjançant la combinació de la mesura i mètodes de calibratge multivariant, que es pot veure en la figura 2.4.2.3.

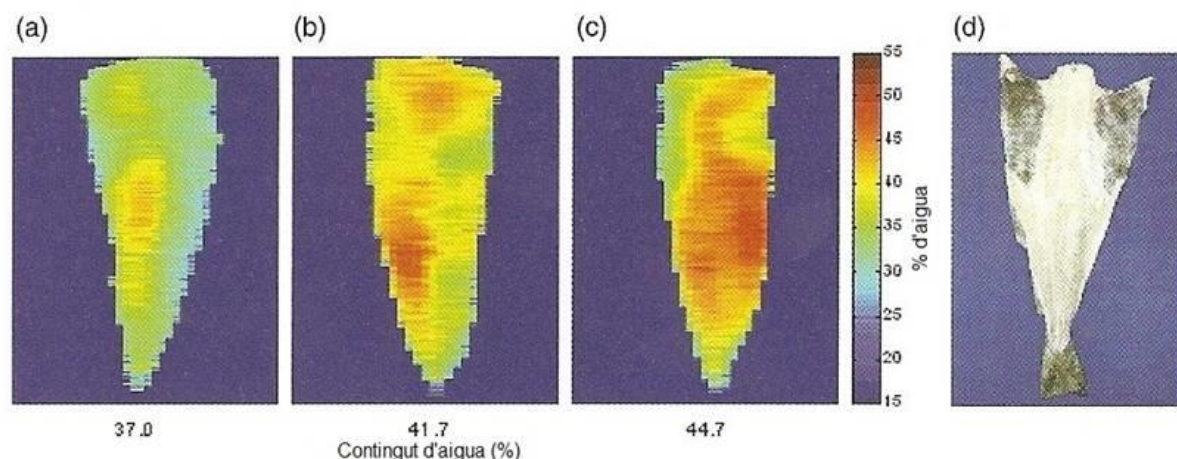


Figura 2.4.2.3 (a-c) Predicció del contingut d'aigua en mostres de bacallà sec a partir d'imatges NIR. d) Imatge original de bacallà sec

L'aparició de les imatges NIR ha tingut una gran repercussió en l'àmbit alimentari i agrícola, ja que proporcionen anàlisis d'alt rendiment amb baixos límits de detecció i milloren la caracterització dels productes. Actualment, la combinació i acoblament d'imatges NIR amb altres sistemes d'adquisició d'imatges resulta molt atractiu per a la descripció completa dels productes i la millora de l'automatització dels seus processos d'elaboració^{24,121}. El desenvolupament de nova maquinària, programari i noves eines d'anàlisis de les dades incrementarà el nombre d'aplicacions i les capacitats analítiques d'aquests sistemes.

2.4.3 Aplicacions en la tecnologia analítica de processos (PAT)

La capacitat de produir constantment productes d'elevada qualitat és una necessitat dins de l'àmbit industrial. El control de qualitat busca assegurar els estàndards de qualitat que es requereixen durant tot el procés de producció, des de l'anàlisi de les matèries primeres i dels productes finals, passant per les etapes intermèdies de l'evolució del procés.

La inspecció visual ha estat un dels mètodes més emprats clàssicament en la indústria alimentària per a l'avaluació de la qualitat de molts productes. Aquest mètode resultava laboriós, lent i poc efectiu. Es requerien mètodes automatitzats per a l'avaluació i control de qualitat per tal de garantir un producte d'alt rendiment i qualitat ¹²². Amb el propòsit de millorar tant el coneixement del procés com la seva qualitat, la FDA (Food and Drug Administration) va publicar un text guia sobre l'ús de la tecnologia de control de processos analítics (PAT). El concepte PAT incideix en la necessitat de controlar la qualitat en tots els punts de procés, concepte conegut en anglès com Quality by Design (QbD), com una alternativa a l'avaluació única de la qualitat dels productes acabats ^{41,123}.

La introducció de la tècnica d'imatges hiperespectrals en el control de processos és un gran i nou avanç en el desenvolupament de metodologies PAT, ja que es pot obtenir informació espectral i espacial durant el procés de fabricació del producte. Especialment les indústries farmacèutiques, alimentària i de producció de materials, on l'activitat de producció i de control de qualitat és altament regulada, han incorporat les imatges hiperespectrals dins les seves metodologies PAT.

Les tècniques hiperespectrals, sobretot les imatges a l'infraroig mitjà, a l'infraroig proper i les imatges Raman, han obert noves vies d'investigació en la indústria farmacèutica, ja que presenten una excel·lent capacitat per a obtenir una informació precisa i fiable en totes les etapes de control del procés de fabricació d'un fàrmac. Per exemple, les imatges es poden utilitzar per a l'estudi de la correcta distribució dels components en les tablettes i mesclades en pols, per a l'estudi de segregació durant la preparació de granulats, per a l'estudi de la interfície entre el recobriment i el nucli de la tableta i per a la detecció de components minoritaris ^{25,54,124–128}. L'ús de les imatges també resulta molt efectiu per a la detecció de falsificacions de fàrmacs que

es troben en el mercat, que solen ser formulacions incorrectes o bé preparats en què el contingut de principi API és inferior al nominal ^{56,129}.

En la figura 2.4.3.1 es mostra la imatge d'un blíster amb comprimits farmacèutics adulterats. La imatge al visible es mostra en la figura 2.4.3.1a i el mapa d'scores de PCA de la imatge adquirida mitjançant NIR es mostra en la figura 2.4.3.1b. Els resultats procedents de la imatge NIR permeten diferenciar el comprimit farmacèutic que conté un principi actiu diferent de l'esperat.

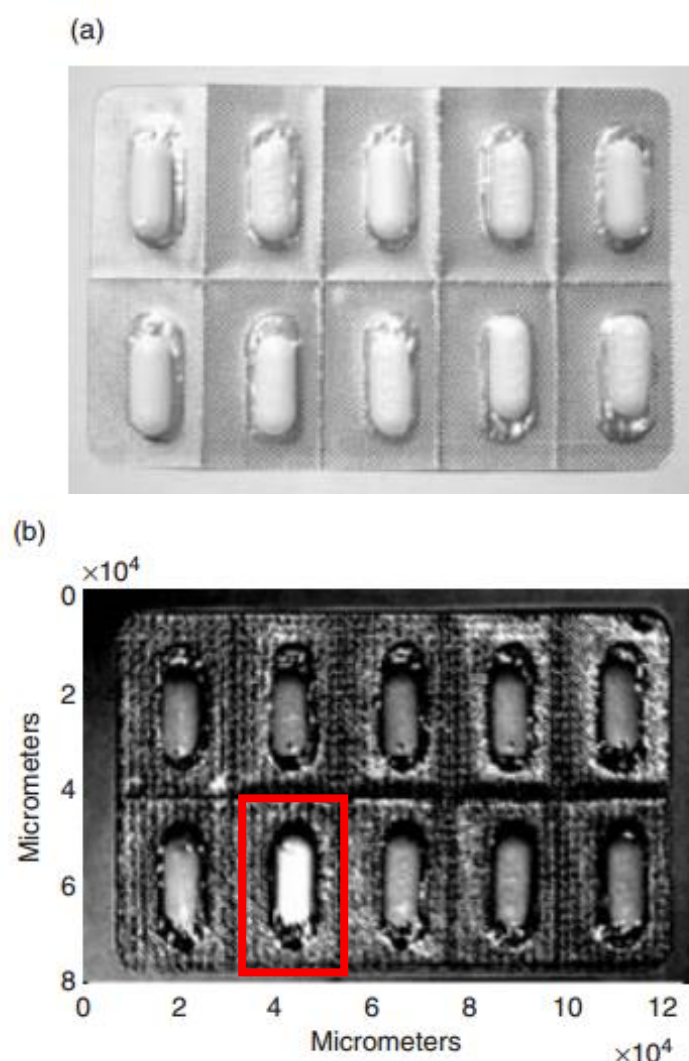


Figura 2.4.3.1 Imatge d'un blíster de comprimits farmacèutics adulterats. **a)** Imatge visible del blíster. **b)** Mapa de scores de PCA del primer component principal de la imatge del blíster adquirida mitjançant espectroscòpia NIR.

Cal destacar que el mode d'adquisició d'imatges ATR-FT-IR és particularment adequat per a l'anàlisi espectroscòpica de comprimits farmacèutics, degut a la nul·la preparació de la mostra. A més, també permet obtenir informació quantitativa. Els sistemes d'imatges ATR-FT-IR permeten, per exemple, l'estudi de polimorfisme, dels efectes del pH en el medi de dissolució de l'alliberament del fàrmac, de l'efecte de càrrega del fàrmac... Anàlisis d'alt rendiment de moltes formulacions farmacèutiques es poden dur a terme simultàniament mitjançant l'ús d'imatges ATR-FT-IR sota condicions ambientals controlades ⁶³.

Les imatges Raman no s'associen al control i anàlisi de rutina industrial, ja que el temps d'anàlisi és molt lent, cosa que fa impossible l'estudi immediat de les propietats químiques i físiques del producte. Per contra, aquests sistemes presenten una elevada resolució espacial i espectral, perfecta per a estudis preliminars sobre aspectes del producte que es vol fabricar, com per exemple, l'avaluació del polimorfisme dels productes farmacèutics o la distribució dels principis actius (API) i els excipients en les diferents etapes d'un cicle de formulació, estudi totalment necessari per a la posterior automatització del control de processos ^{130,131}.

La figura 2.4.3.2 és un exemple d'imatge Raman d'un comprimit farmacèutic. En la figura 2.4.3.2a es poden diferenciar tres API: l'aspirina (píxels vermells), el paracetamol (píxels verds) i la cafeïna (píxels blaus). Les figures 2.4.3.2b i 2.4.3.2c són imatges de regions que presenten una elevada resolució espacial i que permeten la identificació d'un quart constituent, la cel·lulosa (píxels grocs), i la caracterització de la mida i la forma de les partícules.

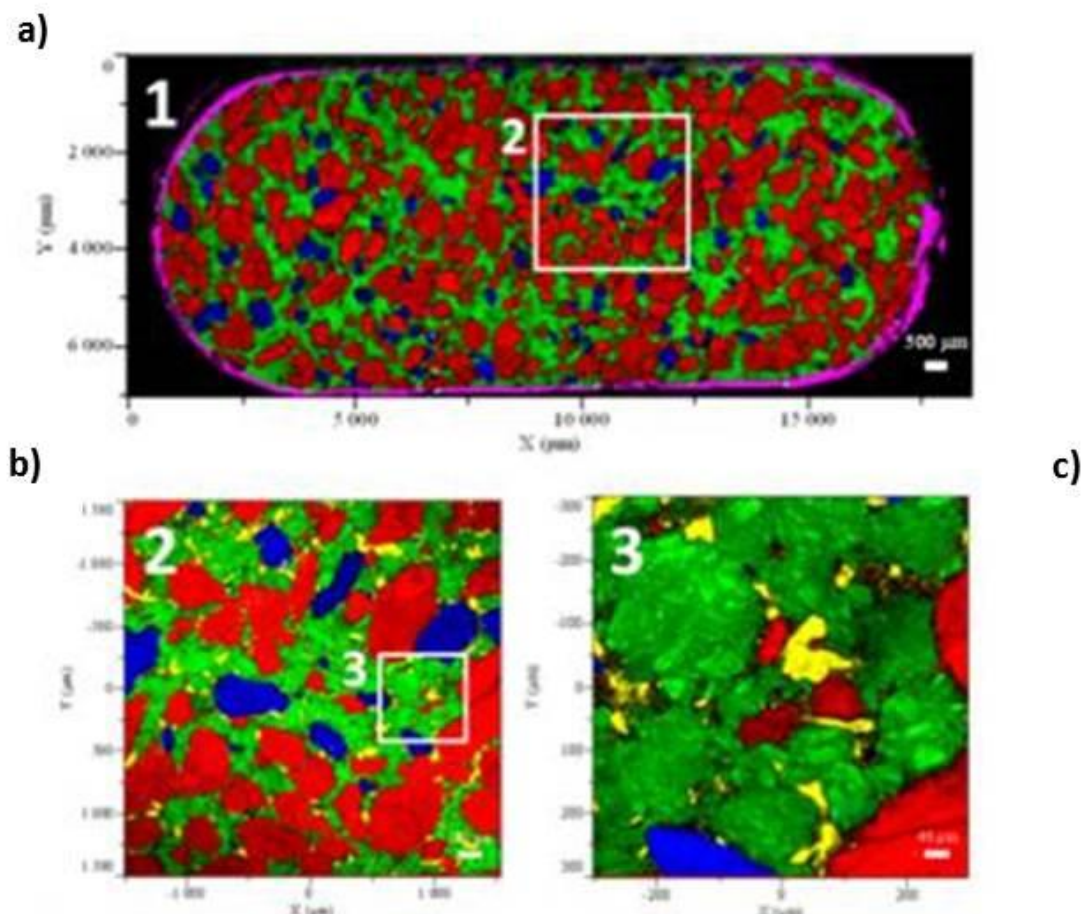


Figura 2.4.3.2 a) Mapa d'un comprimit farmacèutic on es poden diferenciar tres API: aspirina (vermell), paracetamol (verd) i cafeïna (blau). **b)** Imatge d'àrea 2, on es pot veure l'excipient cel·lulosa (groc). **c)** Imatge d'alta resolució de l'àrea 3, on es pot observar la mida i la forma dels cristalls.

L'acoblament d'imatges procedents de diferents plataformes espectroscòpiques pot aportar informació complementària i descriure de manera completa un producte. Clarke et al assenyalen la possibilitat de fusió d'imatges Raman i FT-NIR per a avaluar la qualitat de formulacions farmacèutiques¹³². Altres estudis han realitzat acoblament Raman no només amb imatge al NIR, sinó també amb imatges a l'infraroig mitjà¹³³ per a la identificació de característiques estructurals dels components polimèrics⁹⁸. També s'han combinat imatges hiperespectrals amb microscòpia electrònica de rastreig per a la caracterització de mesclures de polímers¹³⁴.

L'acoblament d'imatges presenta dificultats, ja que les mesures adquirides amb diferents tècniques i presentar diferents resolucions espacials. Calen doncs, mètodes de preprocessat

robustos per a resoldre aquestes dificultats i així poder dur a terme l'anàlisi conjunta de les imatges²⁵.

Les imatges hiperespectrals es poden trobar vinculades a altres aspectes de la tecnologia analítica de processos, com per exemple, en la classificació i control de qualitat de materials, com polímers¹³⁵, ceràmiques¹³⁶, minerals, materials reciclats,...ja que permeten l'anàlisi a temps real de mostres macroscòpiques.

Com ja s'ha vist, les imatges hiperespectrals són una eina essencial en el control i l'anàlisi de rutina dins la tecnologia analítica de processos (PAT). Els sistemes d'adquisició d'imatges estan evolucionant ràpidament des del punt de vista tecnològic (millora de la resolució, velocitat i robustesa) i del tractament *in situ* de les dades, la qual cosa farà que siguin molt més presents en un futur proper en l'àmbit industrial.

2.5 BIBLIOGRAFIA

- (1) Borengasser, M., S.Hungate, W., and Watkins, R. Hyperspectral Remote Sensing: Principles and Applications. (Weng, Q., Ed.) Tailor&Fra. New York.
- (2) Rosenfeld, A. (1982) Digital Picture processing Academic P. Florida.
- (3) Schotton, D. (1993) Electronic Light Microscopy Techniques in Modern Biomedical Microscopy. Wiley&Sons, Ltd, New York.
- (4) Prat, W. (1978) Digital Image Processing. Wiley&Sons. Ltd, New York.
- (5) B.Campbell, J. (1987) Introduction to Remote Sensing. Guilford P. New York.
- (6) Rosenfeld, A. (1969) Picture preprocessing Academic P. New York.
- (7) J.Anselmo, V., and H.Reilly, T. (1979) Medical diagnosis system and method with multispectral imaging.
- (8) B. Kahle, A., and Goetz, A. (1983) Mineralogic Information from a New Airborne Thermal. *Science* 222.
- (9) A.Sobrino, J. (1989) Teledetección (A.Sobrino, J., Ed.) Guada Impr. València.
- (10) Vane, G., and F.H. Goetz, A. (1993) Terrestrial imaging spectrometry: Current status, future trends. *Remote Sens. Enviroment* 44, 117–126.
- (11) F.R.Gower, J., A.Borstad, G., D.Anger, C., and R.Edel, H. (1982) No Title. *Can. Remote Sens.* 18, 199–208.
- (12) Mooradian, G., Weiderhold, M., E.Dabiri, A., and Coyle, C. (1998) Hyperspectral imaging methods and apparatus for non-invasive diagnosis of tissue for cancer.
- (13) Kim, M. S., Chen, Y. R., and Mehl, P. M. (2001) Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety 44, 721–729.
- (14) Polder, G., G.W.A. van der Heyden, M., and Young, I. T. (2002) Hyperspectral image analysis. *Trans. ASAE* 45, 1155–1161.
- (15) Geladi, P., and Grahn, H. (1996) Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis John Wiley. Chichester,UK.
- (16) F.Grahn, H., and Geladi, P. (2007) Techniques and Applications of hyperspectral Image analysis John Wiley. Ltd.

- (17) W.T. Krooshof, T., J.Postma, G., J.Melssen, W., and Buydens, M. C. (2009) Evaluation of spectroscopic images, in *Biomedical Imaging: Principles and Applications* (Salzer, R., Ed.) John Wiley. Ltd.
- (18) Tran, T. N., Wehrens, R., and Buydens, L. M. C. (2005) Clustering multispectral images: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 77, 3–17.
- (19) ElMasry, G., and Sun, D.-W. (2010) Principles of Hyperspectral Imaging Technology, in *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* (Sun, D.-W., Ed.), pp 3–45. Academic Press.
- (20) Sahlin, J. J., and Peppas, N. A. (1997) Near-field FTIR Imaging : A Technique for Enhancing Spatial Resolution in FTIR Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 103–110.
- (21) Miseo, E. V, and Wright, N. A. (2003) Developing a Chemical-Imaging Camera. *Ind. Phys.* 29–32.
- (22) Aiko, M. (2001) Hyperspectral Prism-Grating-Prism Imaging Spectrograph. University of Oulu.
- (23) P.Wold, J., Johansen, I.-R., H.Haugholt, K., Tschudi, J., Thielemann, J., Segtnan, V. H., Naruma, B., and Woldb, E. (2006) Non-contact transfectance near infrared imaging for representative on-line sampling of dried salted coalfish (bacalao). *J. Near Infrared Spectrosc.* 14, 59–66.
- (24) Mehl, P. M., Chen, Y.-R., Kim, M. S., and Chan, D. E. (2004) Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations. *J. Food Eng.* 61, 67–81.
- (25) Amigo, J. M. (2010) Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 93–109.
- (26) M.Miller, L., Wang, Q., P.Telivala, T., J.Smith, R., Lanzirrotti, A., and Miklossy, J. (2005) Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol* 155, 30–7.
- (27) Wang, Q., Kretlow, A., Beekes, M., Naumann, D., and Miller, L. (2005) In situ characterization of prion protein structure and metal accumulation in scrapie-infected cells by synchrotron infrared and X-ray imaging. *Vib.Spectrosc.* 38, 61–9.
- (28) M.Miller, L. (2009) Biomedical Applications of Infrared Microspectroscopy Using Synchrotron Radiation, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Salzer, R., and W.Siesler, H., Eds.), pp 451–468. Wiley-VCH.
- (29) Kretlow, A., Wang, Q., Kneipp, J., Lasch, P., Beekes, M., Miller, L., and Naumann, D. (2006) FTIR-microspectroscopy of prion-infected nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 948–59.
- (30) D.Tran, C. (2005) Principles, Instrumentation, and Applications of Infrared Multispectral Imaging, An Overview. *Anal. Lett.* 38, 735–752.

- (31) R.Griffiths, P. (2009) Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Salzer, R., and W. Siesler, H., Eds.), pp 3–62. Wiley-VCH.
- (32) Tran, C. D., and Furlan, R. J. (1992) Acousto-optic tunable filter as a polychromator and its application in multidimensional fluorescence spectrometry. *Anal. Chem.* 64, 2775–82.
- (33) Tran, C. D. (1997) Principles and analytical applications of acousto-optic tunable filters, an overview. *Talanta* 45, 237–48.
- (34) Baptista, M. S., and Tran, C. D. (1997) Near-infrared thermal lens spectrometer based on an erbium-doped fiber amplifier and an acousto-optic tunable filter, and its application in the determination of nucleotides. *Appl. Opt.* 36, 7059–65.
- (35) Alexander, T. A., Gao, G., and Tran, C. D. (1997) Development of a Novel Fluorimeter Based on Superluminescent Light-Emitting Diodes and Acousto-Optic Tunable Filter and Its Application in the Determination of Chlorophylls a and b. *Appl. Spectrosc.* 51, 1603–1606.
- (36) Pasquini, C., Lu, J., Tran, C. D., and Smirnov, S. (1996) Detection of flow injection analysis with pH gradient by acousto-optic tunable filter based spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 319, 315–324.
- (37) J.Cheng, L., C.Mahoney, J., F Reyes, G., and R.Suiter, H. (1994) Target Detection Using an AOTF Hyperspectral Imager. *Proc. SPIE* 2237, 251–259.
- (38) J.Miller, P. (1995) Multispectral imaging with liquid crystal tunable filter. *Proc. SPIE* 2345, 354–365.
- (39) C.Gebhart, S., C.Thompson, R., and Mahadevan-Jansen, A. (2007) Liquid-crystal tunable filter spectral imaging for brain tumor demarcation. *Appl. Opt.* 46, 1896–1910.
- (40) Lewis, N. E., J.Treado, P., C.Reeder, R., M.Story, G., E.Dowrey, A., Marcott, C., and W.Levin, I. (1995) Fourier Transform Spectroscopic Imaging Using an Infrared Focal-Plane Array Detector. *Anal.Chem.* 67, 3377–3381.
- (41) C. Cairós, J. (2009) Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo. Caracterización instrumental y aplicación al análisis de. Universitat Autònoma de Barcelona.
- (42) R. Griffiths, P., and A. de Haseth, J. (1986) Fourier Transform Infrared Spectrometry. Wiley-Interscience, New York.
- (43) Bhargava, R., and W.Levin, I. (2001) Fourier Transform Infrared Imaging: Theory and Practice. *Anal.Chem.* 73, 5157–5167.
- (44) Barton, J., Cannata, R., and Petronio, S. (2002) InGaAs NIR focal plane arrays for imaging and DWDM applications. *Proc. SPIE* 4721, 37–47.

- (45) Gunapala, S., Bandara, S., Bock, J., Ressler, M., Liu, J., Mumolo, J., Rafol, S., Ting, D., and Werner, M. (2001) Large Format Long-Wavelength GaAs/AlGaAs Multi-quantum Well Infrared Detector Arrays for Astronomy. *Proc. SPIE 4288*, 278–285.
- (46) J.Cohen, M., and G.Olsen, H. (1993) Room-temperature InGaAs camera for NIR imaging. *Proc. SPIE 1946*, 436–443.
- (47) J.Kozlowski, L. (1997) HgCdTe focal plane arrays for high performance infrared cameras. *Proc. SPIE 3179*, 200–211.
- (48) J.Kozlowski, L., Vural;K, M.Aria, J., E.Tennant, W., and DeWames. (1997) Performance of HgCdTe, InGaAs and quantum well GaAs/AlGaAs staring infrared focal plane arrays. *Proc. SPIE 3182*, 2–13.
- (49) Rogalski, A. (2010) Infrared detectors. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- (50) Rogalski, A. (2012) Progress in focal plane array technologies. *Prog. Quantum Electron.* 36, 342–473.
- (51) Peguero, A. (2010) La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados. Universitat Autònoma de Barcelona.
- (52) W.Ciurcak, E. (2001) Principles of near-infrared spectroscopy, in *Handbook of Near-Infrared Analysis* (W.Ciurcak, E., and A.Burns, D., Eds.) 2nd ed. Marcel Dekker Inc, New York/Basel.
- (53) Kazarian, S. G., and Chan, K. L. A. (2013) ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *Analyst* 138, 1940–51.
- (54) Gendrin, C., Roggo, Y., and Collet, C. (2008) Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 533–53.
- (55) Pierna, J. a. F., Baeten, V., Renier, a. M., Cogdill, R. P., and Dardenne, P. (2004) Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J. Chemom.* 18, 341–349.
- (56) Dubois, J., Wolff, J., Warrack, J. K., Schoppelrei, J., and Lewis, E. N. (2007) NIR Chemical Imaging for Counterfeit Pharmaceutical Products Analysis Counterfeit pharmaceutical products are a real threat to the health of patients, and to the health of patients. *Spectroscopy* 22.
- (57) Qin, J., and Renful, L. (2008) Measurement of the optical properties of fruits and vegetables using spatially resolved hyperspectral diffuse reflectance imaging technique. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 355–365.
- (58) Magwaza, L. S., Opara, U. L., Nieuwoudt, H., Cronje, P. J. R., Saeys, W., and Nicolaï, B. (2011) NIR Spectroscopy Applications for Internal and External Quality Analysis of Citrus Fruit—A Review. *Food Bioprocess Technol.* 5, 425–444.

- (59) Kazarian, S. G., and Chan, K. L. a. (2006) Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 858–67.
- (60) Boskey, A., and Pleshko Camacho, N. (2007) FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* 28, 2465–78.
- (61) Quaroni, L., and Zlateva, T. (2011) Infrared spectromicroscopy of biochemistry in functional single cells. *Analyst* 136, 3219–3232.
- (62) Krafft, C., and Sergo, V. (2006) Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy* 20, 195–218.
- (63) G.Kazarian, S., L.Andrew Chan, K., and H.Tay, F. (2009) ATR-FT-IR Imaging for Pharmaceutical and Polymeric Materials: From Micro to Macro Approaches, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Salzer, R., and W.Siesler, H., Eds.), pp 347–376. Wiley-VCH, Weinheim.
- (64) S.Colley, C., G.Kazarian, S., D.Weinberg, P., and J.Lever, M. (2004) Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques. *Biopolymers* 74, 328–335.
- (65) Downes, A., and Elfick, A. (2010) Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors (Basel)*. 10, 1871–89.
- (66) Annamdevula, N. S., Sweat, B., Favreau, P., Lindsey, A. S., Alvarez, D. F., Rich, T. C., and Leavesley, S. J. (2013) An approach for characterizing and comparing hyperspectral microscopy systems. *Sensors (Basel)*. 13, 9267–93.
- (67) Leblond, F., C.Davis, S., A.Valdés, P., and W.Pogue, B. (2010) Preclinical Whole-body Fluorescence Imaging: Review of Instruments, Methods and Applications. *J.Photochem Photobiol* 98, 77–94.
- (68) Ntziachristos, V., Bremer, C., and Weissleder, R. (2003) Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur. Radiol.* 13, 195–208.
- (69) Zavattini, G., Vecchi, S., Mitchell, G., Weisser, U., Leahy, R. M., Pichler, B. J., Smith, D. J., and Cherry, S. R. (2006) A hyperspectral fluorescence system for 3D in vivo optical imaging. *Phys. Med. Biol.* 51, 2029–43.
- (70) Martin, M. E., Wabuyele, M. B., Chen, K., Kasili, P., Panjehpour, M., Phan, M., Overholt, B., Cunningham, G., Wilson, D., Denovo, R. C., and Vo-Dinh, T. (2006) Development of an advanced hyperspectral imaging (HSI) system with applications for cancer detection. *Ann. Biomed. Eng.* 34, 1061–8.
- (71) Martin, M. E., Wabuyele, M., Panjehpour, M., Overholt, B., DeNovo, R., Kennel, S., Cunningham, G., and Vo-Dinh, T. (2006) An AOTF-based dual-modality hyperspectral imaging system (DMHSI) capable of simultaneous fluorescence and reflectance imaging. *Med. Eng. Phys.* 28, 149–155.

- (72) Weissleder, R. (2001) A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 19, 316–317.
- (73) Vo-Dinh, T., L. Stokrd, D., Wabuleyele, M. B., Martin, M. E., M.Song, J., Jagannathan, R., Michaud, E., Lee, R. J., and Pan, X. (2004) A hyperspectral imaging system for in vivo optical diagnostics. *Eng. Med. Biol. Mag.* 40–49.
- (74) D.Watrous, J., Alexandrov, T., and C.Dorrestein, P. (2011) The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological research. *J Mass Spectrom* 46, 209–222.
- (75) Caprioli, R. M., Farmer, T. B., and Gile, J. (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* 69, 4751–60.
- (76) Chaurand, P., Latham, J. C., Lane, K. B., Mobley, J. A., Polosukhin, V. V, Wirth, P. S., Nanney, L. B., and Caprioli, R. M. (2008) Imaging Mass Spectrometry of Intact Proteins from Alcohol-Preserved Tissue Specimens: Bypassing Formalin Fixation research articles. *J. Proteome Res.* 3543–3555.
- (77) Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., Bonnel, D., Vergara, D., Jacquet, A., Vinatier, D., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., and Salzert, M. (2009) MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 2023–33.
- (78) Seeley, E. H., and Caprioli, R. M. (2008) Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18126–31.
- (79) Van Remoortere, A., van Zeijl, R. J. M., van den Oever, N., Franck, J., Longuespée, R., Wisztorski, M., Salzert, M., Deelder, A. M., Fournier, I., and McDonnell, L. a. (2010) MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 1922–9.
- (80) Burnum, K. E., Cornett, D. S., Puolitaival, S. M., Milne, S. B., Myers, D. S., Tranguch, S., Brown, H. A., Dey, S. K., and Caprioli, R. M. (2009) Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *J. Lipid Res.* 50, 2290–8.
- (81) Amstalden van Hove, E. R., Smith, D. F., and Heeren, R. M. a. (2010) A concise review of mass spectrometry imaging. *J. Chromatogr. A* 1217, 3946–54.
- (82) Guerquin-Kern, J.-L., Wu, T.-D., Quintana, C., and Croisy, A. (2005) Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 228–38.
- (83) Sjövall, P., Lausmaa, J., and Johansson, B. (2004) Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Anal. Chem.* 76, 4271–8.
- (84) Touboul, D., Halgand, F., Brunelle, A., Kersting, R., Tallarek, E., Hagenhoff, B., and Laprévote, O. (2004) Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal. Chem.* 76, 1550–9.

- (85) Spraggins, J. M., and Caprioli, R. M. (2011) High-speed MALDI-TOF imaging mass spectrometry: rapid ion image acquisition and considerations for next generation instrumentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 1022–31.
- (86) Greer, T., Sturm, R., and Li, L. (2011) Mass spectrometry imaging for drugs and metabolites. *J. Proteomics* 74, 2617–31.
- (87) McDonnell, L. A., and Heeren, R. M. A. (2007) Imaging mass spectrometry. *mass Spectrom. Rev.* 606–643.
- (88) Chandra, S., Smith, D. R., and Morrison, G. H. (2000) Peer Reviewed: A Subcellular Imaging by Dynamic SIMS Ion Microscopy. *Anal. Chem.* 72, 104 A–114 A.
- (89) Balas, C. (2009) Review of biomedical optical imaging—a powerful, non-invasive, non-ionizing technology for improving in vivo diagnosis. *Meas. Sci. Technol.* 20, 1–12.
- (90) Krafft, C. (2009) Vibrational Spectroscopic Imaging of Soft tissue, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Siesler, R. S. and H. W., Ed.), pp 113–143. WILEY.
- (91) Max Diem, R.Griffiths, P., and M. Chalmers, J. (Eds.). (2008) *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, pp 1–70. Wiley&Sons.
- (92) Schultz, R. A., Nielsen, T., Zavaleta, J. R., Ruch, R., Wyatt, R., and Garner, H. R. (2001) Bioimaging Hyperspectral Imaging : A Novel Approach For Microscopic Analysis. *Cytometry* 247, 239–247.
- (93) M. Kazanci, P., P.Roschger, E., Paschalis, K., and Fratzla Klaushofer, P. (2006) Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation–composition. *J. Struct. Biol* 156, 489–496.
- (94) Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G., and Sergo, V. (2008) Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophotonics* 1, 154–69.
- (95) Fabian, H., Lasch, P., Boese, M., and Haensch, W. (2003) Infrared microspectroscopic imaging of benign breast tumor tissue sections. *J. Mol. Struct.* 661-662, 411–417.
- (96) Fabian, H., Thi, N. A. N., Eiden, M., Lasch, P., Schmitt, J., and Naumann, D. (2006) Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 874–82.
- (97) Fabian, H., Lasch, P., Boese, M., and Haensch, W. (2002) Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections. *Biopolymers* 67, 354–7.
- (98) Benard, A., Desmedt, C., Smolina, M., Szternfeld, P., Verdonck, M., Rouas, G., Kheddoumi, N., Rothé, F., Larsimont, D., Sotiriou, C., and Goormaghtigh, E. (2014) Infrared imaging in breast cancer: automated tissue component recognition and spectral characterization of breast cancer cells as well as the tumor microenvironment. *Analyst* 139, 1044–56.

- (99) Pu, Y., Wang, W., Yang, Y., and Alfano, R. R. (2013) Native fluorescence spectra of human cancerous and normal breast tissues analyzed with non-negative constraint methods. *Appl. Opt.* 52, 1293–301.
- (100) McNaughton, D., R.Bambery, K., and Wood, B. R. (2008) Spectral Hispathology of the Human Cervix, in *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis* (Diem, M., R.Griffiths, P., and M.Chalmers, J., Eds.), pp 187–202. John Wiley & Sons,Ltd, Chichester,UK.
- (101) R.Bambery, K., R.Wood, B., A.Quinn, M., and McNaughton, D. (2004) Fourier Transform Infrared Imaging and Unsupervised Hierarchical Clustering Applied to Cervical Biopsies. *Aust.J.Chem* 57, 1139–1143.
- (102) Lasch, P., and Naumann, D. (1998) FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cell. Mol. Biol* 44, 189–202.
- (103) Burattini, E., Malvezi-Campeggi, F., Chilosi, M., Conti, C., Ferraris, P., Monti, F., Sabbatini, S., Tosi, G., and Zamo, A. (2007) No Title. *J.Mol.Struct* 834-836, 170–175.
- (104) Romeo, M., Mohlenhoff, B., and Diem, M. (2006) Infrared micro-spectroscopy of human cells: Causes for the spectral variance of oral mucosa (buccal) cells. *Vib. Spectrosc.* 42, 9–14.
- (105) Ntziachristos, V., and Chance, B. (2001) Probing physiology and molecular function using optical imaging: applications to breast cancer. *Breast Cancer Res* 3, 41–46.
- (106) Andersson-Engels, S., Klinteberg, C., Svanberg, K., and Svanberg, S. (1997) In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Phys. Med. Biol.* 42, 815–824.
- (107) Wong, S., Chan, C., Ma, B., Lam, M., Choi, G., Au, T., Chan, A., and Chan, A. (2009) Advanced proteomic technologies for cancer biomarker discovery. *Exp Rev Prot* 6, 123.
- (108) Solon, E. G., Schweitzer, A., Stoeckli, M., and Prideaux, B. (2010) Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development. *AAPS J.* 12, 11–26.
- (109) Brunelle, A., and Laprévote, O. (2009) Lipid imaging with cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Bional Chem* 31–35.
- (110) McDonnell, L. a, Corthals, G. L., Willems, S. M., van Remoortere, A., van Zeijl, R. J. M., and Deelder, A. M. (2010) Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J. Proteomics* 73, 1921–44.
- (111) N.Goward, S., and G.Masek, J. (2001) The Landsat 7 mission: Terrestrial research and applications for the 21st century. *Remote Sens. Enviroment* 78, 1–2.
- (112) Asner, G. P., Nepstad, D., Cardinot, G., and Ray, D. (2004) Drought stress and carbon uptake in an Amazon forest measured with spaceborne imaging spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6039–44.

- (113) Branch, L. E., Division, E. S., Agency, U. S. E. P., Division, W. R., and Survey, U. S. G. (2003) Aquatic vegetation mapping using hyperspectral remote sensing. 383–392.
- (114) Artigas, F., and Pechmann, I. C. (2010) Balloon imagery verification of remotely sensed *Phragmites australis* expansion in an urban estuary of New Jersey, USA. *Landsc. Urban Plan.* 95, 105–112.
- (115) Charan Sahu, K. (2008) Textbook of Remote Sensing and Geographical Information Systems. Atlantic Publishers & Distributions, New Delhi.
- (116) Chen, Y., Chao, K., and Kim, M. S. (2002) Machine vision technology for agricultural applications. *Comput. Electron. Agric.* 36, 173–191.
- (117) Nicolai, B. M., Lötze, E., Peirs, A., Scheerlinck, N., and Theron, K. I. (2006) Non-destructive measurement of bitter pit in apple fruit using NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 1–6.
- (118) Ariana, D. P., Lu, R., and Guyer, D. E. (2006) Near-infrared hyperspectral reflectance imaging for detection of bruises on pickling cucumbers. *Comput. Electron. Agric.* 53, 60–70.
- (119) Gowen, A., O'Donnell, C., Cunell, P., Downey, G., and Frias, J. (2007) Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends Food Sci.* 18, 590–598.
- (120) Feng, Y.-Z., Elmasry, G., Sun, D.-W., Scannell, A. G. M., Walsh, D., and Morcy, N. (2013) Near-infrared hyperspectral imaging and partial least squares regression for rapid and reagentless determination of Enterobacteriaceae on chicken fillets. *Food Chem.* 138, 1829–36.
- (121) Kim, M. S., Chen, Y.-R., Cho, B.-K., Chao, K., Yang, C.-C., Lefcourt, A. M., and Chan, D. (2007) Hyperspectral reflectance and fluorescence line-scan imaging for online defect and fecal contamination inspection of apples. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 1, 151–159.
- (122) Gunasekaran, S. (1996) Computer vision technology for food quality assurance. *Trends Food Sci. Technol.* 71.
- (123) Gowen, A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., and Bell, S. E. J. (2008) Recent applications of Chemical Imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 10–22.
- (124) Amigo, J. M., Cruz, J., Bautista, M., MasPOCH, S., Coello, J., and Blanco, M. (2008) Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 696–713.
- (125) Roggo, Y., Degardin, K., and Margot, P. (2010) Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics. *Talanta* 81, 988–95.
- (126) Reich, G. (2005) Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1109–43.

- (127) Clarke, F. (2004) Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy. *Vib. Spectrosc.* 34, 25–35.
- (128) Piqueras, S., Burger, J., Tauler, R., and de Juan, A. (2012) Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117, 169–182.
- (129) Lewis, E. N., Schoppelrei, J. W., Lee, E., and Kidder, L. H. (2005) Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool, in *Process Analytical Technology* (Bakeev, K. A., Ed.), pp 187–223. Blackwell Publishing.
- (130) Piqueras, S., Duponchel, L., Tauler, R., and de Juan, A. (2014) Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis. *Anal. Chim. Acta* 819, 15–25.
- (131) Juan, A. de, Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M., and Maeder, M. (2004) Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 70–79.
- (132) C. Clarke, F., J. Jamieson, M., A. Clark, D., V. Hammond, S., D. Jee, R., and C. Moffat, A. (2001) Chemical Image Fusion. The Synergy of FT-NIR and Raman Mapping Microscopy To Enable a More Complete Visualization of Pharmaceutical Formulations. *Anal. Chem.* 79, 2213–2220.
- (133) Chan, K. L. a., Fleming, O. S., Kazarian, S. G., Vassou, D., Chrysikos, G. D., and Gionis, V. (2004) Polymorphism and devitrification of nifedipine under controlled humidity: a combined FT-Raman, IR and Raman microscopic investigation. *J. Raman Spectrosc.* 35, 353–359.
- (134) Gupper, A., Wilhelm, P., Schmied, M., G. Kazarian, S., L.A. Chan, K., and Reußner, J. (2002) Combined Application of Imaging Methods for the Characterization of a Polymer Blend. *Appl. Spectrosc.* 56, 1515–1523.
- (135) Leitner, R., Mairer, H., and Kercek, a. (2003) Real-time classification of polymers with NIR spectral imaging and blob analysis. *Real-Time Imaging* 9, 245–251.
- (136) Bonifazi, G., and Serranti, S. (2006) Imaging spectroscopy based strategies for ceramic glass contaminants removal in glass recycling. *Waste Manag.* 26, 627–39.

CAPÍTOL 3:

Experimental

3.1 PRESENTACIÓ DE LES IMATGES HIPERESPECTRALS ESTUDIADES

Les imatges hiperespectrals han suposat una gran revolució en diferents àrees, especialment en el camp de la biomedicina¹⁻⁷ i en el control de processos i de productes acabats en la indústria farmacèutica⁸⁻¹⁶. En aquesta tesi s'ha volgut investigar el potencial de l'ús de les imatges hiperespectrals Raman i IR combinades amb quimiometria per a l'estudi de diferents problemes d'interès en aquests camps d'aplicació. La tria de la tècnica s'ha fet en funció de la finalitat de l'estudi. Per això en aquest capítol es descriuen les capacitats i límits de l'ús de cada tècnica espectroscòpica per als diferents tipus de mostres i àmbits d'aplicació investigats. L'optimització dels paràmetres instrumentals ha estat clau en cadascun dels estudis que s'especifiquen en detall a continuació. Cal recordar que la informació obtinguda a partir d'aquestes tècniques ha de ser adequadament tractada amb mètodes d'anàlisi multivariant per a la bona interpretació química de la mesura^{17,18}.

Com exemples concrets de l'àmbit farmacèutic, s'ha volgut demostrar el potencial de la microscòpia Raman per a l'estudi acurat del polimorfisme dels productes farmacèutics i la utilitat de les imatges d'IR proper per a l'estudi qualitatiu, quantitatiu i d'heterogeneïtat de formulacions farmacèutiques.

En l'àmbit biomèdic, es mostra la utilitat de les imatges Raman amb transformada de Fourier per a l'anàlisi de càlculs renals, formats majoritàriament per compostos inorgànics. També s'ha estudiat l'ús de les imatges FT-IR per a l'anàlisi de teixits biològics i de les imatges en la regió de l'infraroig mitjà amb radiació de sincrotró per a l'anàlisi d'una sola cèl·lula.

Per últim, una mescla de productes farmacèutics han estat analitzada per ambdues tècniques espectroscòpiques amb la finalitat de dur a terme l'acoblament multiconjunt d'aquests dos tipus de mesures i d'aquesta manera poder descriure el sistema de forma completa amb la informació que proporcionen cadascuna de les tècniques.

3.2 INSTRUMENTACIÓ

En les properes subseccions es descriuen els sistemes d'adquisició d'imatges utilitzats i es fa una breu descripció de les característiques de les imatges hiperespectrals adquirides i els estudis amb els quals es relacionen.

3.2.1 Sistemes d'adquisició d'imatges Raman

Les imatges Raman analitzades en aquesta tesi han estat obtingudes mitjançant els equips que es descriuen a continuació:

- a) Sistema d'espectroscòpia d'imatges **Raman per transformada de Fourier RFS 100/S, Bruker**. És un espectrofotòmetre d'escaneig ràpid equipat per a l'obtenció d'espectres Raman a la regió de l'infraroig proper. L'instrument empra un làser Nd:YAG que emet a una longitud d'ona de 1064 nm amb una potència màxima de 500 mW. El sistema es caracteritza pel gran compartiment de mostra i la gran varietat d'accessoris que permeten l'accés a tot tipus de mostres líquides, sòlides i gasoses (vegeu figura 3.2.1.1). L'equip permet l'anàlisi ràpida en un interval espectral de 3600 fins a 70 cm^{-1} amb el mode d'adquisició *point mapping*.



Figura 3.2.1.1 Sistema d'imatges Raman per transformada de fourier NIR RFS100S de la companyia Bruker.

- b) Sistema d'imatges Raman **Labram HR, HORIBA YVON**. Aquest instrument, s'adapta perfectament a les escales de mesura micro i macro i ofereix capacitats avançades d'imatge confocal en 2D i 3D. L'ús del diafragma confocal proporciona imatges d'elevada resolució espacial amb una intensitat de senyal elevada.

L'equip permet l'ús de diversos làsers d'excitació, entre els quals els més comuns són el làser doble Nd:YAG a 532 nm, el làser de He-Ne a 632 nm i el làser de diode a 785 nm i 840 nm. El microscopi pot estar equipat d'objectius de diferents augments 10x, 50x i 100x i d'objectius de llarga distància focal. L'equip permet l'obtenció d'espectres Raman des de la regió de l'Ultraviolat-Visible fins a l'infraroig proper amb un gran interval de valors de resolució espectral, des de 0.3 cm^{-1} fins a 1 cm^{-1} .

Les imatges poden ser adquirides en mode *point scanning*, però LabRam HR ofereix dos modes de treball avançats que permeten el registre d'imatges en qüestió de segons/minuts. SWIFTTM és un dels modes avançats d'adquisició d'imatges Raman ultraràpid que permet l'adquisició d'imatges en segons sense pèrdua de resolució espacial. DuoScanTM és l'altre mode innovador de treball que es basa en una combinació de miralls d'exploració que mouen el feix del làser a través d'un patró seleccionat per

l'usuari: una línia per als perfils lineals, o bé una àrea d'escaneig que permeti l'obtenció de píxels d'àrees més grans i, conseqüentment, d'imatges a escala macroscòpica. Aquest últim mode amplia la capacitat de l'equip per proveir imatges a escala macroscòpica cobrint àrees de píxel completes de $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$ gràcies a la mobilitat d'escaneig que presenten els miralls. En la figura 3.2.1.2 es mostra una fotografia de l'equip LabRam HR disponible al laboratori LASIR de l'Université de Lille, Sciences et Technologie (França).

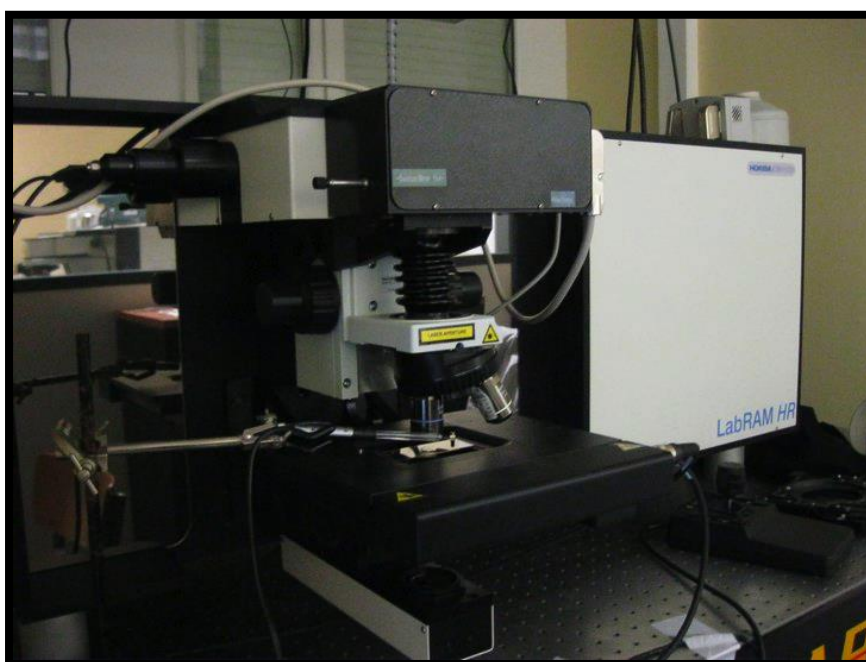


Figura 3.2.1.2 Microscòpia confocal del sistema LabRAM HR disponible a Lille per a l'adquisició d'imatges Raman.

- c) Sistema d'adquisició d'imatges **RamanRXN1, Kaiser Optical Systems** (vegeu figura 3.2.1.3). Aquest sistema permet l'obtenció d'espectres Raman a la regió de l'infraroig mitjà i proper de mostres líquides, sòlides i gasoses. És un sistema robust i flexible, atesa l'àmplia gamma d'aplicacions d'anàlisis associades a l'acoblament de sondes òptiques a l'instrument. El sistema es troba format per un làser de díode multimodal (Invictus Kaiser), un espectrometre f/1.8 amb una xarxa de difracció hologràfica en mode de transmissió (Kaiser) i un detector CCD amb un sistema de refrigeració Peltier acoblat a un

microscopi confocal. El microscopi té objectius de diferents augments 10x,20x,50x,100x i també disposa d'objectius d'immersió d'oli i un objectiu de llarga distància focal.

El disseny f/1.8 és un disseny òpticament eficient que permet recollir sis vegades més llum que els dissenys tradicionals. És un sistema fàcil d'utilitzar i compacte, capaç de proporcionar de forma ràpida imatges d'elevada resolució espacial en un interval espectral ampli. Les imatges poden ser adquirides a través del mode *point scanning* o en mode *imaging* i/o vídeo mitjançant la utilització de microsondes.



Figura 3.2.1.3 Analitzador RamanXN1TM de la companyia Kaiser Optical Systems

3.2.2 Sistemes d'adquisició d'imatges IR

Sistemes d'adquisició d'imatges d'infraroig proper

L'adquisició d'imatges hiperespectrals a l'infraroig proper va ser possible gràcies a l'estada en el laboratori de Quimiometria i Equilibris en Solució del Dr. James Burger. El Dr James Burger va fundar l'empresa BurgerMetrics SIA l'any 2007. L'objectiu de l'empresa és proporcionar sistemes

d'adquisició d'imatges hiperespectrals amb programari associat per al tractament de la mesura. L'empresa dissenya accessoris personalitzats de maquinari i programari per a maximitzar i millorar el rendiment dels sistemes d'adquisició d'imatges hiperespectrals NIR i l'anàlisi de les mostres d'interès.

Concretament en el nostre cas, James Burger va dissenyar un sistema d'obtenció d'imatges a l'infraroig proper que treballa en mode *line scanning*. El sistema es trobava format per una càmera, una plataforma motoritzada que assegurava el moviment sistemàtic necessari en una de les direccions espacials, un conjunt de làmpades de tungstè col·locades en línia i un detector MCT. L'equip era d'ús fàcil, compacte i portàtil i permetia l'obtenció d'imatges a escala macroscòpica en qüestió de pocs minuts (vegeu figura 3.2.2.1). En la imatge de la figura 3.2.2.1. es poden veure uns estàndards sòlids davant de l'equip. Abans de dur a terme la mesura, va ser necessari calibrar l'instrument amb els estàndards sòlids que marcaven el 0% i el 100% de l'escala de reflectància (R).

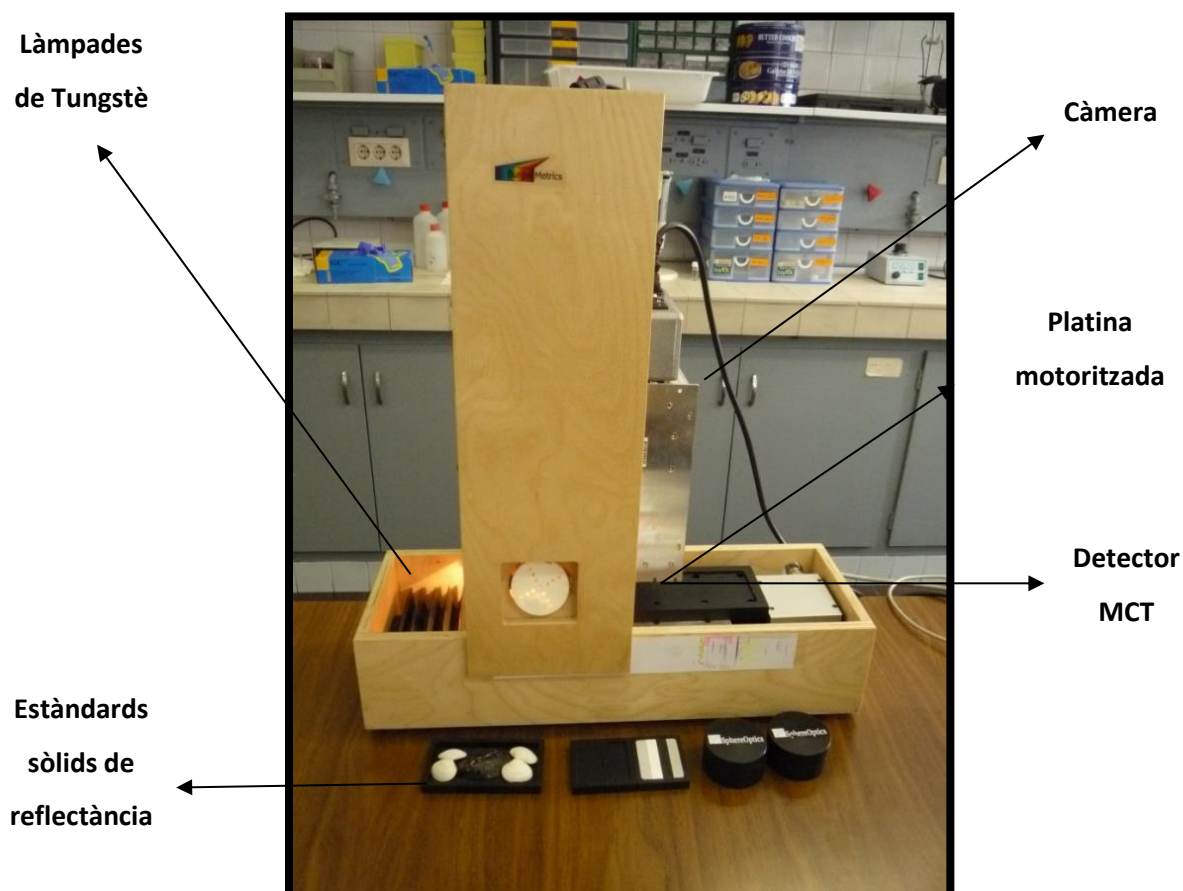


Figura 3.2.2.1 Sistema d'imatges NIR i estàndards sòlids de reflectància manufacturats per BurgerMetrics.

Sistemes d'adquisició d'imatges d'infraroig mitjà amb Transformada de Fourier (FT-IR)

Avui en dia la majoria d'instruments utilitzats en espectroscòpia d'infraroig estan equipats amb sistemes d'anàlisi que utilitzen transformades de Fourier. Aquest disseny permet enregistrar simultàniament dades espectrals en un ampli interval de longitud d'ona.

Les imatges de microscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier van ser obtingudes a través de 3 sistemes diferents descrits a continuació:

- a) Sistema d'imatges d'infraroig amb transformada de Fourier **Nicolet iN10 MX, Thermo**. Permet obtenir i analitzar imatges químiques amb rapidesa. Nicolet In10 MX té integrat un microscopi d'imatge d'infraroig, on es troben la font d'excitació a l'infraroig, l'objectiu *Cassegrain* permanentment alineat de 15x, l'interferòmetre i el detector MCT (Mercuri, Cadmi i Tel·luri) (vegeu figura 3.2.2.2). És un sistema d'adquisició d'imatges d'infraroig amb transformada de Fourier econòmic i compacte.

El sistema permet enregistrar els espectres en mode de transmissió i reflectància en un interval espectral de 350 fins a 7500 cm^{-1} . Les imatges poden ser adquirides per escombratge de píxels per punts (*point mapping*) o per pla focal (*focal plane scanning*). Es poden obtenir imatges de mostres de micròmetres d'àrea fins a mm. Per exemple una imatge de 1,2 mm×1,2 mm és obtinguda per escombratge per pla focal en 40 segons amb una resolució espectral de 16 cm^{-1} i una resolució espacial de 25 μm .



Figura 3.2.2.2 Sistema d'imatges d'infraroig amb transformada de Fourier integrat Nicolet iN10 MX de la companyia Thermo.

- b) Sistema d'infraroig amb transformada de Fourier **Nicolet FT-IR 5700** acoblat a un microscopi de reflexió confocal **Nicolet Continuum XL**. Aquest equip té la capacitat d'adquirir imatges a l'infraroig d'elevada resolució espacial. El microscopi presenta l'opció de ser acoblat a una línia de radiació d'infraroig d'alt rendiment, com per exemple la radiació de sincrotró i a una excel·lent microscòpia de llum visible per generar dades químiques fiables i d'alta resolució espacial. El microscopi es troba format per diversos objectius òptics de 4x, 10x, 20x, 40x, objectiu *Cassegrain* de 15x i l'opció d'un objectiu ATR de cristall de germani, seleniür de zinc o diamant.

Aquest sistema d'infraroig està equipat amb un detector de mercuri, cadmi i tel·luri refrigerat amb nitrogen líquid (MCT-A). Els espectres poden ser enregistrats en mode de transmissió, reflectància i reflectància total atenuada (ATR) en un interval espectral de 350 fins a 7800 cm^{-1} . Les imatges poden ser obtingudes mitjançant escombratge per píxels o pla focal.

- c) Sistema d'imatges **VARIAN FT-IR** equipat amb un microscopi confocal **620 Varian**. Aquest sistema permet l'obtenció d'imatges d'elevada resolució espacial i espectral a escala microscòpica i macroscòpica; és a dir, té la capacitat de mesurar mostres de micròmetres fins a metres d'àrea. És un equip versàtil que inclou mesures de transmissió, reflectància i reflectància total atenuada (ATR) (vegeu figura 3.2.2.3).

Les imatges poden ser mesurades per escombratge de píxels per punts, per línies o per pla focal, gràcies al detector FPA de 64×64 píxels del qual disposa. L'equip també ofereix la possibilitat d'obtenir imatges en mode de mosaic. Aquest mode d'adquisició registra una sèrie d'imatges FT-IR cobrint l'àrea total de la mostra. El conjunt de totes les imatges forma la imatge global de la mostra. L'opció de registre en mode de mosaic permet l'obtenció d'imatges de grans dimensions. Els espectres poden ser enregistrats de manera ultraràpida en un interval espectral que comprèn des de l'ultraviolat-visible fins l'infraroig llunyà.



Figura 3.2.2.3 Sistema d'imatges a l'infraroig amb transformada de Fourier format per un espectrofotòmetre Varian 670 acoblat a un microscopi confocal VARIAN 620 de la companyia Agilent.

3.3 DESCRIPCIÓ D'IMATGES I ESTUDIS RELACIONATS

3.3.1 Disseny d'un protocol metodològic per a la resolució individual d'imatges Raman. Estudi d'imatges de càlculs renals

L'objectiu de l'estudi és demostrar el potencial de la microscòpia Raman per l'adquisició d'imatges d'alta resolució espacial d'una gran varietat de mostres biològiques de gran interès^{1,2,19–24}, que degudament tractades amb mètodes d'anàlisi multivariant, duren a la resolució, la identificació i el coneixement de la distribució dels constituents biològics a les mostres.

Concretament, el primer exemple d'estudi va ser l'anàlisi de dues seccions d'un càlcul renal. Existeixen diferents tipus de càlculs segons les substàncies que han originat la seva formació. És important la identificació i distribució d'aquestes substàncies per a reconèixer el tipus de càlcul i triar la profilaxi ideal per al pacient.

Les imatges dels càlculs renals van ser cedides pel Dr. Ludovic Duponchel del laboratori LASIR (Laboratoire de Spectroscopie Infrarouge et Raman), de la Université des Sciences et Technologies de Lille (França).

Els dos talls de càlcul renal van ser subministrats per un hospital francès. Els càlculs renals van ser tallats i polits per a obtenir una superfície llisa, apta per a l'adquisició de la imatge. Les imatges van ser adquirides amb l'espectròmetre NIR FT-RAMAN Bruker RFS 100/s descrit anteriorment. Es va emprar el làser Nd: YAG a una potència de 100 Mw. Les imatges es van adquirir en un interval espectral de 404-3500 cm^{-1} , amb una resolució espectral de 4 cm^{-1} i un temps d'adquisició de 5 s per a cada espectre.

Les imatges van ser adquirides en mode d'escombratge per píxels individuals (*point scanning*). Es va seleccionar un pas de 50 μm entre dues posicions espacials consecutives de la mostra. Les dimensions de les imatges van ser de (60×70×775) per al càlcul renal A i de (60×63×775) per al càlcul renal B, on els dos primers valors fan referència al nombre de píxels en les direccions x i y i el tercer al nombre de canals espectrals. La dimensió real de la superfície analitzada va ser de 3mmx3,5mm per al càlcul renal A i 3mmx3,15mm per al càlcul renal B.

En la figura 3.3.1.1 es troben representats els mapes d'intensitat global dels càlculs renals A i B, respectivament. El mapa d'intensitat global és la representació de la suma de totes les intensitats Raman de cadascun dels espectres de la imatge en funció del píxel en què s'ha recollit l'espectre. Els càlculs renals estudiats són exemples de mostres que contenen components majoritaris (A) i components minoritaris (B), respectivament.

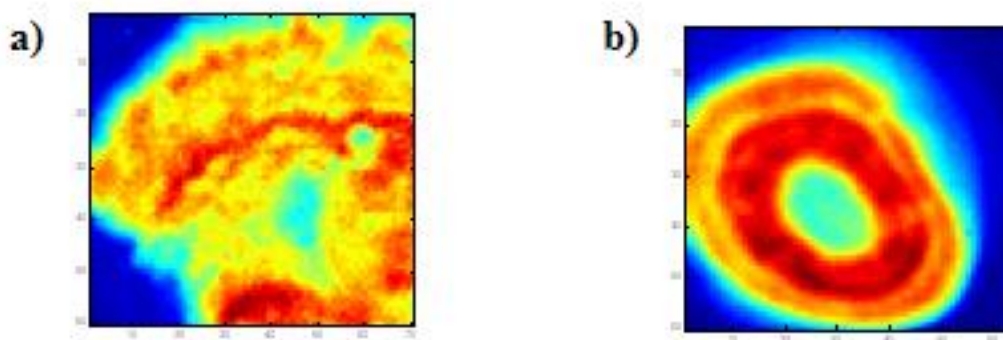


Figura 3.3.1.1 Mapes d'intensitat global dels càlculs renals. **a)** Mapa d'intensitat global del càlcul renal (A). **b)** Mapa d'intensitat global del càlcul renal (B).

3.3.2 Anàlisi quantitativa, qualitativa i d'heterogeneïtat de formulacions farmacèutiques. Estudi d'imatges NIR de mescles de productes farmacèutics

Dins els processos de control farmacèutic les activitats més comunes són la determinació de la quantitat d'API en una formulació i el control de la distribució uniforme dels components del fàrmac en el producte acabat^{9,11,18}. En aquesta memòria hem volgut estudiar la viabilitat de l'ús de les imatges NIR per a la quantificació de principis actius i excipients i per a l'avaluació del grau d'homogeneïtzació del producte final.

L'exemple estudiat es va centrar en l'anàlisi de diverses mescles d'àcid acetil salicílic i cafeïna com a principis actius i de midó com a excipient.

Es van analitzar mescles sòlides de cafeïna, àcidacetilsalicílic (AAS) i midó de diferents composicions i proporcions. Els reactius utilitzats en la preparació de les mescles són de la casa

Sigma Aldrich, presenten un percentatge de puresa $\geq 99,9 \%$ i s'han utilitzat sense cap procés addicional de purificació. La preparació de les mostres va consistir en pesar amb balança analítica els components esmentats fins aconseguir la composició desitjada. Algunes mostres estaven formades per mescles binàries d'AAS i midó o de cafeïna i midó per a simular una tableta comercial constituïda per un principi actiu i un excipient, i també es van dur a terme mescles ternàries d'AAS, cafeïna i midó en diferents proporcions per a simular fàrmacs de composició més complexa. Les proporcions dels diferents components de les mescles s'han triat per a representar un interval de composicions força complet. La composició de cadascuna de les mescles realitzades es pot trobar a la taula 3.3.2.1.

Un cop els components de la mostra van ser pesats i introduïts als vials, la mescla es va homogeneïtzar per agitació manual i es va dipositar part del sòlid en unes plaques de plàstic amb petits compartiments circulars. Les plaques de plàstic estan constituïdes per 8 pous de 15 mm de diàmetre cadascun. En cadascuna de les plaques es col·loquen només dues mostres, en pous situats en extrems oposats de la placa per tal d'evitar qualsevol possible contaminació entre mostres. Abans d'adquirir la imatge, la superfície sòlida de la mostra s'allisa.

Taula 3.3.2.1 Proporcions de les mescles binàries i ternàries d'àcid acetilsalicílic, cafeïna i midó.

Mostres	AAS (%)	MIDÓ (%)	CAFEÏNA(%)
1	16,13	83,57	0
2	50,01	49,99	0
3	79,82	20,13	0
4	84,20	15,80	0
5	72,54	27,46	0
6	0	83,51	16,49
7	0	50,97	49,03
8	0	29,87	70,13
9	0	24,25	75,75
10	0	53,25	46,75
11(b)	16,87	19,63	63,50
12(b,c,d,e,am,bm,cm,dm,em)	20,48	52,54	26,98
13(b)	38,35	26,40	35,25
14(b)	51,98	31,16	16,86

Es va adquirir una imatge per a cadascuna de les composicions de la taula 3.3.2.1. Per a cadascuna de les mescles ternàries es van obtenir replicats d'imatge (composicions ternàries etiquetades amb la lletra b a la taula 3.3.2.1) i per a la composició de la mescla ternària 12 es van obtenir replicats de mostra (etiquetades amb la lletra m a la taula 3.3.2.1) i replicats addicionals d'imatge (etiquetades amb les lletres c, d i e a la taula 3.3.2.1). Els replicats d'imatge són imatges adquirides sobre la mateixa porció de mostra, que s'han recollit separades en el temps i que impliquen un reposicionament de la mostra en l'instrument. Els replicats de mostra en canvi, van consistir en l'adquisició d'imatges de diferents porcions de material de les mescles preparades, en aquest cas concretament de la composició 12 de la taula 3.3.2.1.

Cadascuna de les imatges, replicats d'imatges i replicats de mostra van ser adquirides mitjançant el sistema d'adquisició d'imatges d'infraroig proper manufacturat pel Dr. James Burger. Les imatges van ser registrades per escombratge per línies de píxels (*line scanning*) en mode de reflectància, ja que el gruix de la mostra no permetia mesures de transmissió. Abans de dur a terme la mesura, es va calibrar l'instrument amb els estàndards sòlids que marcaven el 0% i el 100% de l'escala de reflectància (R). Un cop calibrat l'instrument es va procedir a l'adquisició de

les imatges. Finalment, les imatges de reflectància obtingudes es passen a escala d'absorbància amb la següent operació:

$$A = -\log\left(\frac{1}{R}\right)$$

Les imatges obtingudes presenten un grandària total de 320x350x256 . La mida de píxel és de 108x108 μm^2 i l'interval espectral cobert va des de 950 nm fins a 1660 nm. La figura 3.3.2.1 mostra el mapa d'intensitat global d'una imatge obtinguda sobre una mescla ternària , concretament la mescla 11 (vegeu taula 3.3.2.1).

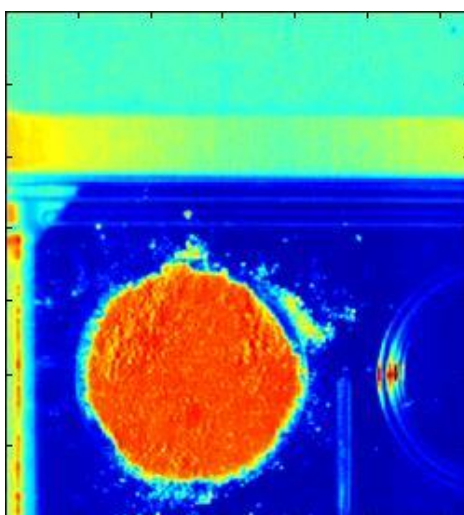


Figura 3.3.2.1 Mapa d'intensitat global d'una mescla ternària 11.

3.3.3 Augment de la resolució espacial original de la imatge. Estudi d'imatges de la cèl·lula HeLa

La microscòpia d'infraroig basada en la transformada de Fourier equipada amb fonts de radiació d'IR convencional ha estat una tècnica emprada durant els últims 20 anys per a nombrosos anàlisis de teixits biològics humans, animals i vegetals ^{2,3,25,26}. L'anàlisi de teixits mitjançant

sistemes d'adquisició d'imatges FT-IR han accelerat satisfactòriament el procés d'automatització per al diagnòstic clínic²⁷⁻³⁰.

No obstant això, la tècnica es troba limitada a l'hora de proporcionar informació detallada sobre l'estructura d'imatges de mostres biològiques petites, com per exemple una única cèl·lula, degut a la baixa resolució espacial que presenta la tècnica espectroscòpica³¹. Només els instruments amb una font de radiació d'alta energia i amb una intensitat altament focalitzada, com ara els que es troben en les instal·lacions del sincrotró, són capaços de proporcionar suficient resolució espacial per a l'anàlisi de mostres molt petites, com són les cèl·lules individuals³²⁻³⁶.

En aquesta tesi s'ha pogut treballar en l'anàlisi de la imatge d'una sola cèl·lula HeLa mitjançant l'ús d'emissió de radiació sincrotró en línia amb un microscopi on l'objectiu principal és l'estudi de la millora de la qualitat de la imatge mitjançant la combinació d'un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial.

Les cèl·lules HeLa utilitzades en aquest estudi van ser cedides per Denis Biard del CEA-DSV-Ircm/INSERM U935, Institut A. Lwoff-CNRS (Villejuif Cedex, France) i les imatges adquirides les va proporcionar F. Jamme del sincrotró SOLEIL (París). Es va seguir una metodologia bàsica per dur a terme els cultius cel·lulars. Abans de cultivar les cèl·lules, els suports low-e (MirriR, Kevley Technologies) van ser esterilitzats a 120 °C. Les cèl·lules van ser incubades durant 3 dies en medi Eagle modificat de Dulbecco (DMEM) amb sèrum de vedella fetal (FCS). Simultàniament, la confluència i el creixement cel·lular eren examinats mitjançant microscopia òptica. Els suports junt amb les cèl·lules en bon creixement van ser esbandits amb DMEM (amb absència de FCS) i antibiòtics durant 1-2 minuts aproximadament. Després les cèl·lules van ser fixades en formaldehid 1,6 % diluït en una solució tampó de fosfat (PBS) a temperatura ambient durant 20 minuts. Finalment, les cèl·lules van ser netejades amb aigua destil·lada durant 5s i es van deixar assecar al aire abans de ser mesurades (vegeu figura 3.3.3.1).

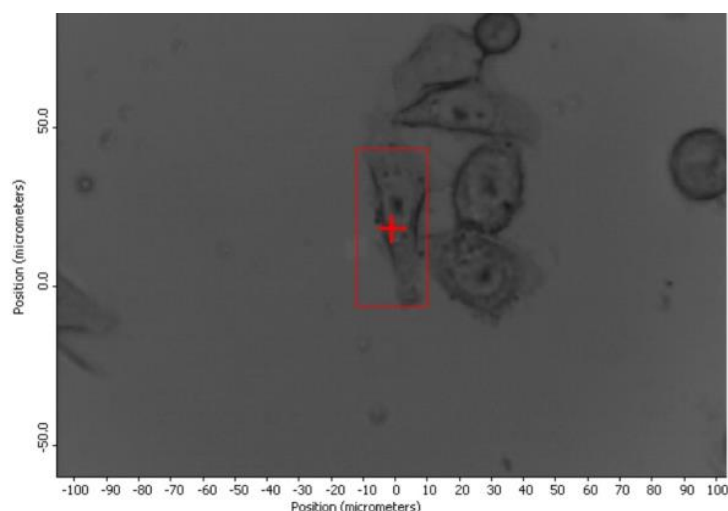


Figura 3.3.3.1 Imatge provinent del microscopi òptic del cultiu de cèl·lules HeLa. El quadre vermell indica l'àrea d'escaneig d'una sola cèl·lula HeLa.

Els cultius cel·lulars es van dur a terme en l'Institut A. Lwoff-CNRS, mentre que l'adquisició de les imatges es va dur a terme al sincrotró SOLEIL situat a París pel Dr. Offroy, del grup LASIR de la Université de Lille1, Sciences et Technologies.

Per a l'obtenció de les imatges es va emprar un sistema d'adquisició FT-IR Thermo Nicolet 5700 acoblat a un microscopi Nicolet Continuum XL. Es va obtenir una imatge d'alta resolució espacial (imatge de referència) i un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial sobre la mateixa mostra. Cadascuna de les imatges de baixa resolució presenta un petit desplaçament espacial respecte l'anterior imatge en la direcció de x i/o de y . Els petits desplaçaments entre imatges cobreixen l'àrea total de la imatge de referència.

Totes les imatges van ser adquirides en mode *point mapping*. Les condicions instrumentals usades van ser diferents en els dos tipus de mesura. La imatge d'alta resolució espacial presenta una dimensió de $63 \times 28 \times 436$ i un pas de píxel de $0,8 \mu\text{m}$. En canvi, les imatges de baixa resolució espacial presenten dimensions de $15 \times 7 \times 436$ i un pas de píxel més gran de $3,5 \mu\text{m}$. Entre cadascuna de les imatges de baixa resolució existeix un desplaçament de $0,6 \mu\text{m}$ en una o les dues direccions espacials de les coordenades dels píxels. Els espectres van ser enregistrats des de 1000 cm^{-1} fins a 4000 cm^{-1} amb una resolució espectral de 16 cm^{-1} amb 50 acumulacions en ambdós tipus de mesura. En la figura 3.3.3.2 es poden observar els mapes d'intensitat global de

la imatge de referència i el mapa d'intensitat global de la mateixa cèl·lula HeLa però en una imatge de baixa resolució espacial.

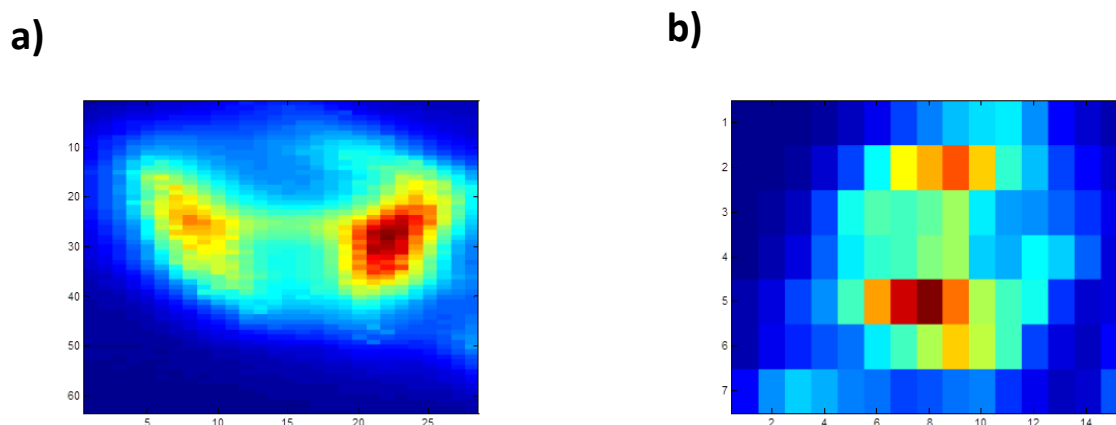


Figura 3.3.3.2 Imatges FT-IR de sincrotró d'una sola cèl·lula HeLa. **a)** Imatge d'alta resolució espacial d'una sola cèl·lula HeLa **b)** Imatge de baixa resolució espacial de la mateixa cèl·lula HeLa.

3.3.4 Interpretació d'un procés seguit per imatges. Estudi d'imatges del sòlid carbamazepina

La finalitat de l'estudi es basa en la interpretació del seguiment de la transformació polimòrfica d'un principi actiu (carbamazepina) amb la temperatura.

La carbamazepina és un fàrmac anticonvulsiu i estabilitzador de l'estat d'ànim. Fins el moment s'han descrit quatre estructures anhidres polimòrfiques de la carbamazepina (vegeu figura 3.3.4.1), una de les quals es forma quan augmenta la temperatura, la forma I^{37,38}. En l'estudi s'ha seguit la transformació de la carbamazepina a temperatura ambient a la forma polimòrfica I en funció de la temperatura.

Es van pesar 0.6 g aproximats de carbamazepina. A continuació, la mostra va ser triturada i posteriorment comprimida amb una premsa d'encuny mecànica per a la formació d'una pastilla amb una superfície totalment plana d'un gruix de 2 mm.

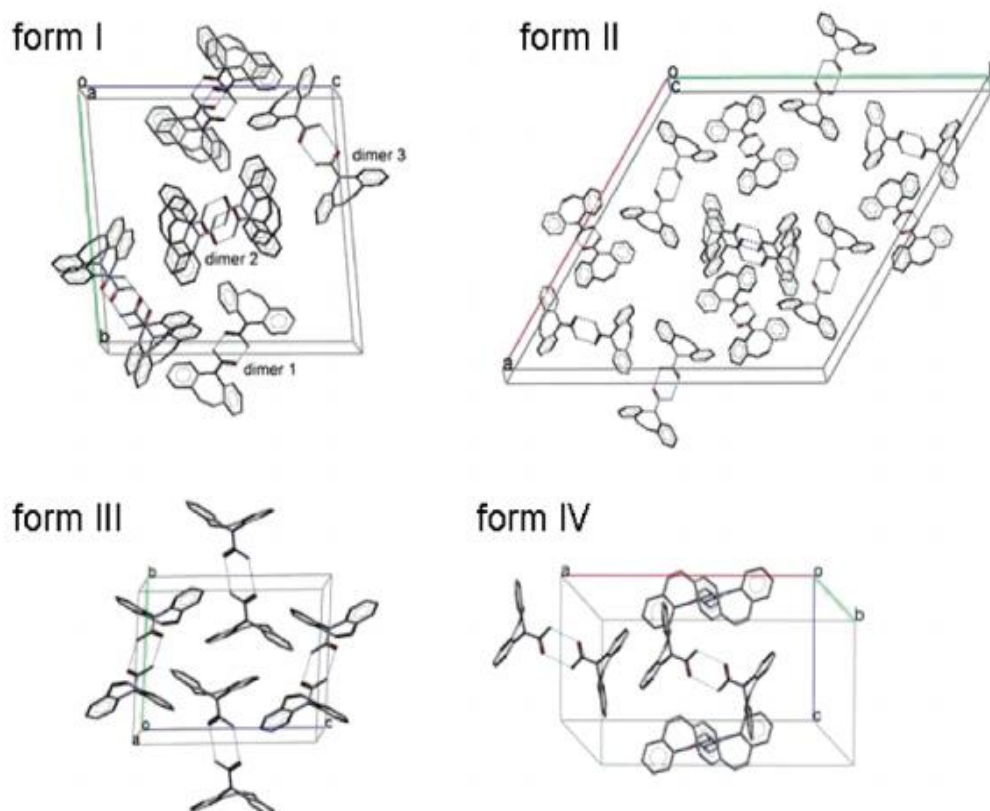


Figura 3.3.4.1 Estructures dels quatre polimorfs coneguts de la carbamazepina. Les línies blaves discontinües indiquen enllaços d'hidrogen. Els tres dímers independents amb enllaços d'hidrogen estan etiquetats en la forma I. Els àtoms d'hidrogen s'han omès per a major claredat.

Les imatges van ser adquirides mitjançant el sistema d'imatges Raman LabRAM HR (Horiba Jobin Yvon) equipat amb el microscopi confocal i un accessori de control de temperatura THM600 de la companyia Linkam (vegeu figura 3.3.4.2) durant una estada al laboratori LASIR, abans esmentat.

La pastilla de carbamazepina es va col·locar en l'accessori presentat a la figura 3.3.4.2. Aquest accessori, que permet el control de la temperatura, va resultar clau en l'estudi de la transformació de la carbamazepina, ja que es va poder seguir el procés *in situ* evitant el reposicionament de la mostra a cada temperatura de control. L'àrea d'estudi de la mostra és la mateixa en totes les imatges; d'aquesta manera es garanteix una bona interpretació de les dades.

Les imatges Raman es van obtenir amb un objectiu de 50x i un làser de He/Ne de longitud d'ona de 632,81 nm. Els paràmetres òptims emprats van ser els següents: un temps d'adquisició de 0,5s

per a cada espectre dins d'un interval espectral de 100 fins a 1650 cm^{-1} . Respecte els paràmetres espacials, la mostra es va compartimentar en 20x20 píxels i es va treballar en mode *point scanning* on es va aplicar l'opció de DuoScanTM ³⁹, per tal d'aconseguir una àrea de píxel macroscòpica de 10x10 μm^2 i escanejar de manera completa una àrea de mostra de 200x200 μm^2 . Es van adquirir nou imatges a diferents temperatures, des de 25 a 160 $^{\circ}\text{C}$. El temps d'adquisició de cada imatge va ser de 40 minuts. Després de cada mesura van ser necessaris uns minuts per a l'estabilització de la mostra a la següent temperatura de treball.



Figura 3.3.4.2 Accessori de control de temperatura de la companyia Linkam.

3.3.5 Disseny d'un protocol metodològic per a la identificació i diferenciació de teixits biològics. Estudi d'imatges FT-IR d'amígdals inflamades i no inflamades

En aquest exemple, es vol mostrar el potencial de les imatges FT-IR per a la diferenciació entre amígdals normals i inflamades.

Les amígdals palatines són acumulacions de teixit limfoide que es troben a la paret lateral de l'orofaringe, a cadascun dels costats de la gola. L'amigdalitis (coneguda col·loquialment com angines) correspon a la infecció i inflamació de les amígdals palatines. L'anàlisi i la interpretació de les imatges FT-IR dels teixits limfoides és una eina complementària en la histologia, que ajuda a prendre decisions objectives sobre el diagnòstic clínic.

Vuit amígdals palatines (quatre amígdals amb amigdalitis crònica i quatre amígdals palatines sense cap símptoma d'inflamació) provinents de diferents pacients van ser cedides pel departament d'otorinolaringologia de l'hospital de la universitat de Jena. Respecte al pretractament de la mostra, es va seguir el següent protocol de treball. Els teixits van ser immediatament congelats a -80°C i van ser submergits en Tissue-Tek fins el seu ús posterior (Sakura Finetek, Països Baixos) per tal d'evitar artefactes de congelació que poguessin fer malbé el teixit. A continuació es van preparar crioseccions de $10\text{ }\mu\text{m}$ de gruix, les quals van ser dipositades en portaobjectes de CaF_2 . Els suports es van deixar assecar a l'aire. Finalment, les crioseccions seques van ser utilitzades per a l'adquisició de les imatges sense cap tractament addicional. Una secció paral·lela del teixit d'amígdala palatina mesurat va ser tenyida amb hematoxilina-eosina (H&E) i es va obtenir la imatge digital mitjançant l'ús d'un microscopi òptic VHX de la casa Kayence (vegeu exemple figura 3.3.5.1).

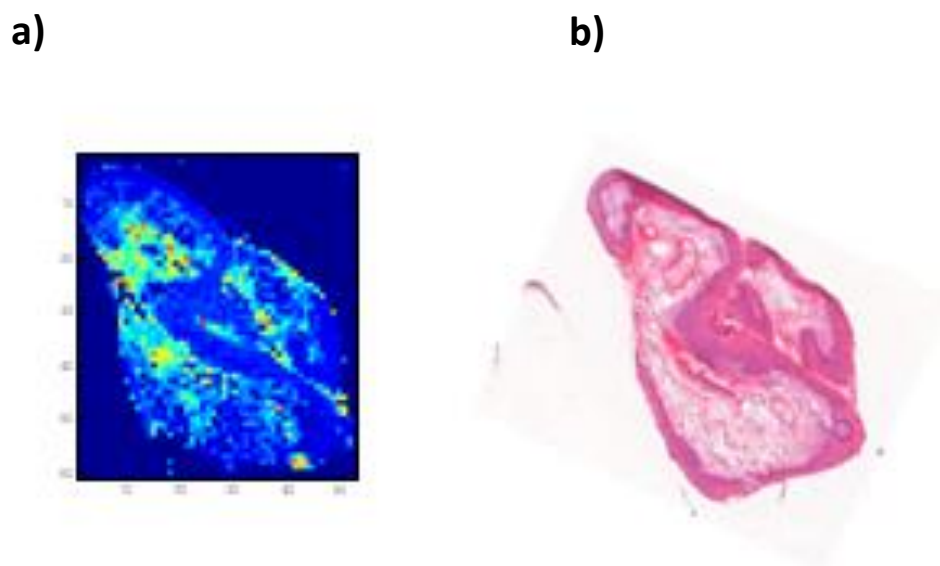


Figura 3.3.5.1 Imatge d'una amígdala palatina normal. **a)** Mapa d'intensitat global de la imatge Raman de l'amígdala palatina. **b)** Imatge òptica de la secció paral·lela tenyida amb H&E de la imatge Raman de l'amígdala palatina.

L'adquisició de les imatges es va dur a terme a l'Institut Tecnològic de Fotònica (IPHT) a Jena (Alemanya), durant una estada predoctoral de 5 mesos. Es van adquirir les imatges de tota l'àrea del teixit per a cadascuna de les 8 amígdales mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre FT-IR Agilent 670 acoblat a un microscopi confocal Agilent 620 i equipat amb un detector FPA de 64x64 píxels. Es va utilitzar un objectiu 15x-Cassegrain junt amb un doble amplificador de feix, que proporcionava una magnificació total de 7.5x i una àrea de visió de $725 \times 705 \mu\text{m}^2$ per imatge. Les seccions dels teixits de les amígdales van ser mesurades en mode de mosaic. Atesa la gran dimensió de les dades, les imatges van ser comprimides, sumant els espectres d'àrees de 2x2 o 4x4 de píxels veïns depenent de la mida real de la secció del teixit.

Les imatges presenten dimensions entre 144x96 píxels (la imatge més petita) fins a 224x192 píxels (la imatge més gran), on l'àrea d'un píxel és de $11 \times 11 \mu\text{m}^2$. Els espectres van ser obtinguts des de 900 cm^{-1} fins a 4000 cm^{-1} amb una resolució espectral de 4 cm^{-1} amb 32 acumulacions.

3.3.6 Estudi de la fusió d'imatges obtingudes amb diferents tècniques espectroscòpiques. Estudi d'una mescla de productes farmacèutics mitjançant MIR i Raman

La finalitat d'aquest estudi se centra en resoldre problemes de preprocessat com són l'alineament espacial de les imatges i la diferent resolució espacial (mida de píxel) que presenten les diferents tècniques, per tal de duu a terme l'anàlisi de l'estructura multiconjunt formada per les imatges procedents de les dues tècniques.

Per a l'anàlisi es va adquirir una imatge d'una mescla de productes farmacèutics. La mescla contenia àcid acetilsalicílic i cafeïna com a principis actius i midó com a excipient. Els reactius utilitzats són de la casa Sigma Aldrich, presenten un percentatge de puresa $\geq 99.9\%$ i s'han utilitzat sense cap procés addicional de purificació.

Experimentalment es va agafar un cristall de cadascun dels productes farmacèutics esmentats per a la preparació de la mescla ternària. A continuació, aquests van ser compactats i premsats a traves de l'ús d'una cel·la de diamant, i es va obtenir una mostra de mescles de productes farmacèutics compacta, llisa i translúcida. El tractament de la mostra va ser necessari per a assegurar l'adquisició correcta de les imatges FT-IR i Raman sobre la mateixa àrea de la mostra.

L'adquisició de la imatge en la regió de l'infraroig mitjà va ser duta a terme amb el sistema Nicolet iN10 de la companyia Thermo disponible en els centres científics i tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB). La mostra va ser compartimentada en 38×32 píxels i enregistrada en mode *point mapping*, on l'àrea de cada píxel va ser de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$. Es va treballar en mode de transmissió ja que la mostra era suficientment prima per a deixar travessar la llum. Cada espectre va ser registrar des de 675 cm^{-1} fins a 4000 cm^{-1} amb una resolució espectral de 4 cm^{-1} .

A l'esquerra de la figura 3.3.6.1 es pot observar el mapa d'intensitat global i a la dreta la imatge del microscòpic òptic de la mostra que es va fer servir com a imatge de referència per a garantir l'adquisició de la mateixa àrea de la mostra en microscòpia Raman.

a)

b)

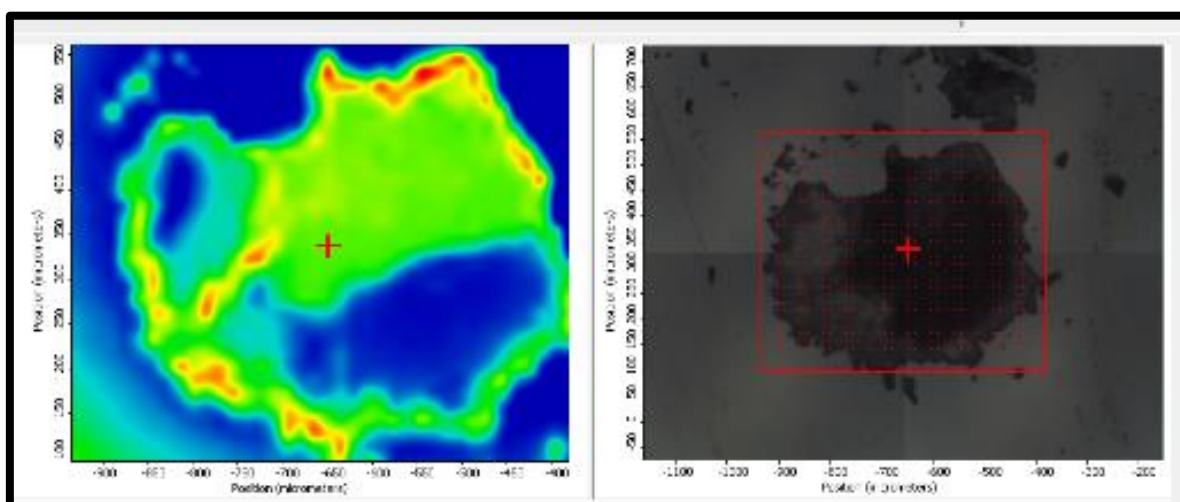


Figura 3.3.6.1 Imatge d'una mescla ternària de productes farmacèutics. **a)** Mapa d'intensitat global de la imatge en la regió de l'infraroig mitjà de la mescla de productes farmacèutics. **b)** Imatge del microscopi òptic de la mescla de productes farmacèutics. El quadre vermell compartimentat per varis punts, és l'àrea d'escombratge de la imatge, on s'ha enregistrat un espectre MIR per a cadascuns dels punts.

Posteriorment es va dur a terme la mesura amb el sistema d'adquisició d'imatges Raman LabRAM disponible en el mateix centre CCiTUB. Durant la mesura es va utilitzar un làser de longitud d'ona d'excitació de 532,058 nm i un objectiu d'augment 50x. Es va recollir un espectre cada 5 s amb dues acumulacions dins d'un interval espectral de 100 fins a 1800 cm^{-1} . Es va emprar l'opció de DuoScanTM amb una mida de píxel de 15x15 μm^2 . La dimensió de la imatge va ser de 38x32x1745. El trasllat i el posicionament de la mostra en cadascun dels instruments va suposar traslacions i rotacions entre les imatges estudiades.

3.4 BIBLIOGRAFIA

- (1) Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G., and Sergo, V. (2008) Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophotonics* 1, 154–69.
- (2) Krafft, C. (2009) Vibrational Spectroscopic Imaging of Soft tissue, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Siesler, R. S. and H. W., Ed.), pp 113–143. Wiley.
- (3) Krafft, C., and Sergo, V. (2006) Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy* 20, 195–218.
- (4) Lasch, P., Pacifico, A., and Diem, M. (2002) Spatially resolved IR microspectroscopy of single cells. *Biopolymers* 67, 335–8.
- (5) Lasch, P., and Naumann, D. (1998) FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques. *Cell. Mol. Biol* 44, 189–202.
- (6) Diem, M., Romeo, M., Boydston-White, S., Miljkovic, M., and Matthäus, C. (2004) A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004). *Analyst* 129, 880–885.
- (7) Diem, M., Mazur, A., Lenau, K., Schubert, J., Bird, B., Miljković, M., Krafft, C., and Popp, J. (2013) Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging. *J. Biophotonics* 6, 855–86.
- (8) Amigo, J. M., Cruz, J., Bautista, M., MasPOCH, S., Coello, J., and Blanco, M. (2008) Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 696–713.
- (9) Gendrin, C., Roggo, Y., and Collet, C. (2008) Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 533–53.
- (10) Roggo, Y., Degardin, K., and Margot, P. (2010) Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics. *Talanta* 81, 988–95.
- (11) Reich, G. (2005) Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1109–43.
- (12) Amigo, J. M. (2010) Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 93–109.
- (13) Clarke, F. (2004) Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy. *Vib. Spectrosc.* 34, 25–35.
- (14) Piqueras, S., Burger, J., Tauler, R., and de Juan, A. (2012) Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117, 169–182.

- (15) Dubois, J., Wolff, J., Warrack, J. K., Schoppelrei, J., and Lewis, E. N. (2007) NIR Chemical Imaging for Counterfeit Pharmaceutical Products Analysis Counterfeit pharmaceutical products are a real threat to the health of patients, and to the health of patients. *Spectroscopy* 22.
- (16) Lewis, E. N., Schoppelrei, J. W., Lee, E., and Kidder, L. H. (2005) Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool, in *Process Analytical Technology* (Bakeev, K. A., Ed.), pp 187–223. Blackwell Publishing.
- (17) Hedegaard, M., Matthäus, C., Hassing, S., Krafft, C., Diem, M., and Popp, J. (2011) Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging. *Theor. Chem. Acc.* 130, 1249–1260.
- (18) Juan, A. de, Maeder, M., Hanczewicz, T., Duponchel, L., and Tauler, R. (2009) Chemometric tools for image analysis' in Infrared and Raman spectroscopy, in *Infrared and Raman Spectroscopy Imaging* (Reiner Salzer, and H. W. S., Ed.), pp 65–109. Wiley-VCH.
- (19) Miljković, M., Chernenko, T., Romeo, M. J., Bird, B., Matthäus, C., and Diem, M. (2010) Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets. *Analyst* 135, 2002–13.
- (20) J.Romeo, M., Boydston-White, S., Mätthaus, C., Miljković, M., Bird, B., Chernenko, T., Lasch, P., and Diem, M. (2008) Infrared and Raman Microspectroscopic Studies of Individual Human cells, in *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis* (Diem, M., R.Griffiths, P., and J. M. C., Eds.), pp 27–71. Wiley.
- (21) Lattermann, A., Matthäus, C., Bergner, N., Beleites, C., Romeike, B. F., Krafft, C., Brehm, B. R., and Popp, J. (2013) Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging. *J. Biophotonics* 6, 110–21.
- (22) Stone, N., Kendall, C., and Barr, H. (2008) Raman Spectroscopy as a Potencial Tool for Early Diagnosis of Malignancies in Esophageal and Bladder Tissues, in *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis* (Diem, M., R.Griffiths, P., and M.Chalmers, J., Eds.), pp 203–231. WILEY.
- (23) Krafft, C., Steiner, G., Beleites, C., and Salzer, R. (2009) Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J. Biophotonics* 2, 13–28.
- (24) Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. H. W., and Salzer, R. (2003) Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 32, 75–83.
- (25) Boskey, A., and Pleshko Camacho, N. (2007) FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials* 28, 2465–78.
- (26) A.Shaw, R., R.Mansfield, J., P. Rempel, S., Low-Ying, S., V. Kupriyanov, V., and H.Mantsch, H. (2000) Analysis of biomedical spectra and images: from data to diagnosis. *J. Mol. Struct. Theochem* 500, 129–138.

- (27) Steller, W., Eienkel, J., Horn, L.-C., Braumann, U.-D., Binder, H., Salzer, R., and Krafft, C. (2006) Delimitation of squamous cell cervical carcinoma using infrared microspectroscopic imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 145–54.
- (28) Fernandez, D. C., Bhargava, R., Hewitt, S. M., and Levin, I. W. (2005) Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. *Nat. Biotechnol.* 23, 469–74.
- (29) Fabian, H., Thi, N. A. N., Eiden, M., Lasch, P., Schmitt, J., and Naumann, D. (2006) Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 874–82.
- (30) Wood, B. R., Chiriboga, L., Yee, H., Quinn, M. A., McNaughton, D., and Diem, M. (2004) Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium. *Gynecol. Oncol.* 93, 59–68.
- (31) Diem, M., Chiriboga, L., Lasch, P., and Pacifico, A. (2002) IR spectra and IR spectral maps of individual normal and cancerous cells. *Biopolymers* 67, 349–53.
- (32) Miller, L. M., and Dumas, P. (2006) Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 846–57.
- (33) M. Miller, L., Wang, Q., P. Telivala, T., J. Smith, R., Lanzirrotti, A., and Miklossy, J. (2005) Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol* 155, 30–7.
- (34) Levenson, E., Lerch, P., and Martin, M. C. (2006) Infrared imaging: Synchrotrons vs. arrays, resolution vs. speed. *Infrared Phys. Technol.* 49, 45–52.
- (35) Dumas, P., Jamin, N., Teillaud, J. L., Miller, L. M., and Beccard, B. (2004) Imaging capabilities of synchrotron infrared microspectroscopy. *Faraday Discuss.* 126, 289.
- (36) R. Griffiths, P. (2009) Infrared and Raman Instrumentation for Mapping and Imaging, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Salzer, R., and W. Siesler, H., Eds.), pp 3–62. Wiley-VCH.
- (37) Grzesiak, A. L., Lang, M., Kim, K., and Matzger, A. J. (2003) Comparison of the Four Anhydrous Polymorphs of Carbamazepine and the Crystal Structure of Form I. *J. Pharm. Sci.* 92, 2260–2271.
- (38) Day, G. M., Zeitler, J. A., Jones, W., Rades, T., and Taday, P. F. (2006) Understanding the Influence of Polymorphism on Phonon Spectra: Lattice Dynamics Calculations and Terahertz Spectroscopy of Carbamazepine 447–456.
- (39) (2014) Horiba Scientific.

CAPÍTOL 4:

Tractament de les dades

4.1 ESTRUCTURA DE LES DADES D'UNA IMATGE. MODEL BILINEAL

Les imatges hiperespectrals són mesures s'estructuren en conjunts de dades molt grans, difícils de tractar i d'emmagatzemar. Darrera aquesta revolució tecnològica de la mesura instrumental, neix la necessitat de crear eines quimiomètriques perquè les dades puguin ser correctament interpretades¹. Abans de dur a terme el tractament de les dades, es important conèixer la naturalesa de la mesura i saber l'objectiu de l'anàlisi.

Pel que fa a la naturalesa de la mesura, la informació continguda en una imatge s'estructura com un cub de dades (3D), on dues de les dimensions defineixen les coordenades dels píxels (x i y) i la tercera dimensió és l'espectral (λ)^{2,3}. L'espectre de qualsevol píxel es pot reproduir a partir de la suma, ponderada per les concentracions, dels espectres purs dels constituents de la imatge. La ponderació de la concentració varia segons la composició de cada píxel, però els espectres dels constituents purs són els mateixos per a tota la imatge.

Aquests conceptes químics poden ser expressats matemàticament mitjançant un model bilineal, com el que es mostra en la figura 4.1.1. El cub de dades pot desplegar-se en una matriu de dades, on les files són els espectres dels píxels un sota l'altre i les columnes designen les longituds d'ona o, en general, els canals espectrals. En forma matricial, la resposta instrumental segueix un model bilineal anàleg a la llei de Lambert-Beer, ja que la contribució del senyal de cada constituent es troba relacionada amb la variació de la seva concentració a cadascun dels píxels. El model bilineal $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$ està format per la matriu \mathbf{D} , que conté els espectres originals de la imatge, la matriu de perfils de concentració (\mathbf{C}) i la matriu d'espectres purs (\mathbf{S}^T) dels constituents presents en la mostra analitzada. \mathbf{E} conté l'error experimental associat al senyal mesurat. Els mapes de distribució de cada constituent s'obtenen replegant el seu perfil de concentració segons l'estructura espacial original de la imatge. Aquesta representació bilineal simplifica l'estudi del cub original de la imatge i proporciona uns resultats fàcils d'interpretar.

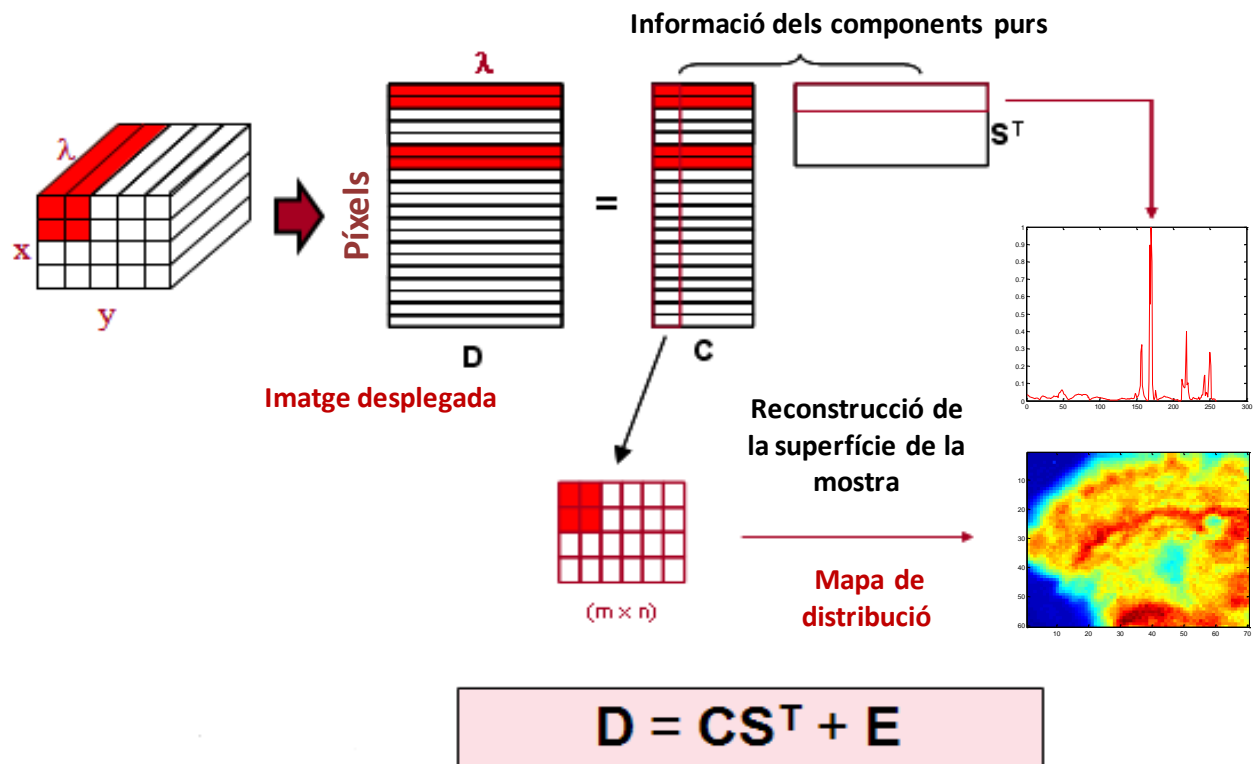


Figura 4.1.1 Representació gràfica del model bilineal de les imatges hiperespectrals

Els mètodes clàssics d'anàlisi d'imatges no permeten treballar amb tota la informació de la mesura, sinó amb representacions parcials, com ara mapes de distribució a determinades longituds d'ona o espectres d'alguns píxels d'especial interès i mapes d'intensitat global (vegeu figura 4.1.2). El mapa d'intensitat global és la representació de la suma de les intensitats de cada canal espectral de cadascun dels espectres de la imatge en funció del píxel en què s'ha recollit l'espectre.

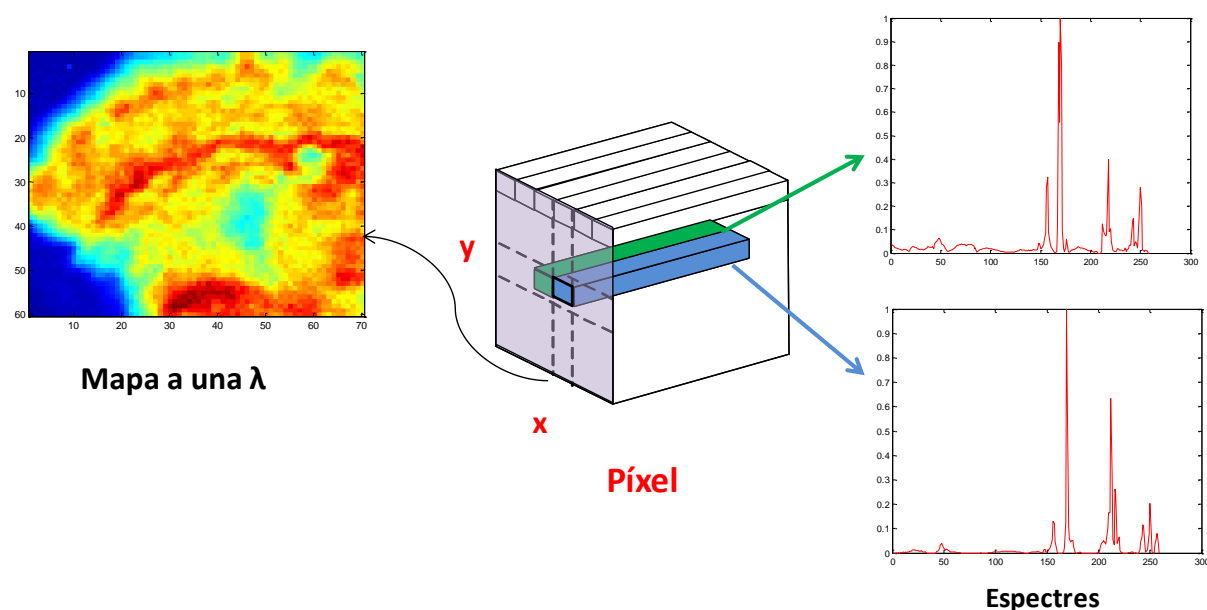


Figura 4.1.2 Estructura de les dades d'una imatge hiperespectral. A la dreta es mostren espectres dels píxels; a l'esquerra, la imatge corresponent a una longitud d'ona.

L'ús d'eines quimiomètriques en l'anàlisi de les imatges és crucial, ja que permet treure partit de tota la informació continguda en la mesura. L'anàlisi d'imatges hiperespectrals és un camp en continu desenvolupament, tot i que ja s'han consolidat certs tipus d'eines que li són específiques. La metodologia més utilitzada, coneguda sota el nom d'anàlisi multivariant d'imatges (o MIA)⁴⁻⁶, ha estat centrada en l'exploració espectral i espacial de la informació continguda en la imatge i s'ha basat fonamentalment en l'ús de l'anàlisi de components principals (PCA)⁷. També són comuns els mètodes clàssics de calibratge multivariant, coneguts com a regressió multivariant d'imatges (MIR)⁸⁻¹⁰ i els mètodes de segmentació de la imatge, que es dediquen a l'assignació dels píxels de la imatge a diferents grups en funció de la similitud espectral que mostren entre ells. Els mètodes de resolució multivariant són una eina recentment incorporada en aquest camp i serveixen per a proporcionar els espectres purs i els mapes de distribució dels diferents constituents de la imatge a partir de la informació continguda en la mesura original. Són, per tant, mètodes que reflecteixen molt adequadament la naturalesa bilineal real de la mesura.

4.2. PREPROCESSAT DE LA IMATGE

El preprocessament en l'anàlisi d'imatges és necessari, ja que normalment la qualitat de les imatges hiperespectrals es veu afectada pel soroll instrumental i per altres distorsions del senyal que impedeixen i dificulten l'anàlisi ¹¹. L'alt nivell de soroll, les irregularitats en la forma i la intensitat de la línia de base o la presència de píxels anòmals són els problemes típics que deterioren el senyal original de la imatge¹². A més de millorar la qualitat de la mesura, el pretractament de la imatge també resulta necessari per a reduir la grandària d'aquest tipus de dades. La reducció de la dimensió de la imatge es coneix amb el nom de compressió.

El tipus de preprocessat utilitzat per a les imatges hiperespectrals dependrà de la naturalesa de les mostres, del tipus de mesura espectroscòpica i de l'objectiu de l'anàlisi. A continuació es descriuen els procediments de preprocessat utilitzats en l'anàlisi de les imatges presentades en aquesta memòria.

4.2.1 Tractament del senyal espectral

El senyal de les imatges hiperespectrals es veu sovint afectat pel soroll instrumental i per altres distorsions del senyal produïdes per la natura i propietats fisicoquímiques de la superfície de la mostra. Aquests artefactes produeixen desviacions en la linealitat de la mesura que dificulten la seva anàlisi i interpretació. S'han estudiat diferents algorismes de preprocessat del senyal espectral adaptats a la tècnica instrumental utilitzada i a la complexitat de la mostra amb l'objectiu d'augmentar la relació senyal-soroll i conservar la naturalesa bilineal de la mesura.

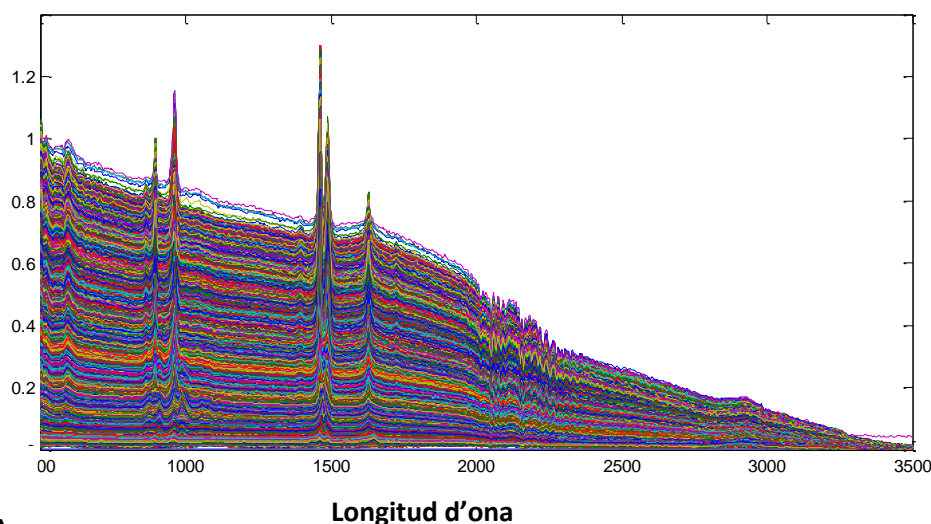
4.2.1.1 Correcció de la línia de base i de la distorsió del senyal

Correcció de la línia de base pel mètode de Mínims Quadrats Asimètrics (AsLS)

La correcció de la línia de base resulta fonamental per al tractament de les dades. Sovint les imatges hiperspectrals presenten línies de base pronunciades i de formes irregulars que dificulten la visualització i interpretació de les bandes d'absorció. Propietats físiques i òptiques intrínseques de la mostra (autofluorescència, dispersió Mie, alteracions en l'índex de reflexió...) són les responsables de les variacions en la línia de base.

L'autofluorescència és el major desafiament que presenta l'espectroscòpia Raman per a l'anàlisi de mostres orgàniques i biològiques. Sovint les transicions electròniques de la dispersió Raman coincideixen amb les emissions de fluorescència. Atès que el senyal de fluorescència pot ser més intens que la dispersió Raman, aquest fet dóna lloc a línies de base pronunciades amb una forma contínua i arrodonida, que dificulten l'anàlisi de les bandes Raman. A continuació es representen els espectres originals d'una imatge Raman d'un càlcul renal, on s'observa la contribució de la fluorescència en els espectres Raman mesurats (vegeu figura 4.2.1.1.1).

a)



b)

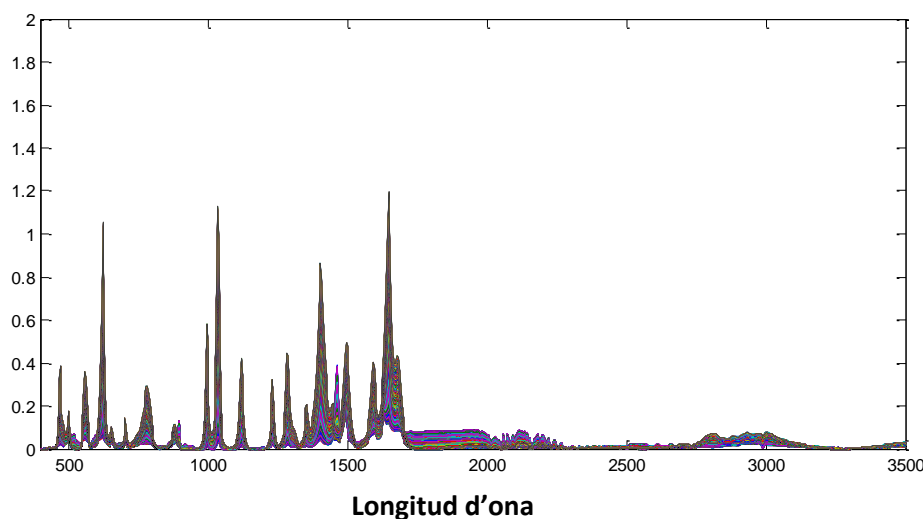


Figura 4.2.1.1.1 a) Espectres originals del càlcul renal (A), **b)** Espectres del càlcul renal (A), després de la correcció de la línia de base mitjançant AsLS.

Anàlogament, la dispersió Mie és una oscil·lació sinusoidal àmplia en la línia de base del espectre que pot donar lloc a distorsions tant en la posició com en la intensitat de les bandes d'absorció en espectres d'IR de mostres biològiques. El fenomen de dispersió Mie es basa en la dispersió de la radiació electromagnètica per partícules esfèriques¹³ i partícules de dimensions similars a la longitud d'ona d'excitació¹⁴. En la figura 4.2.1.1.2 es representen els espectres originals de la imatge de sincrotró FT-IR d'elevada resolució espacial d'una única cèl·lula HeLa, on s'observa la contribució de la dispersió Mie.

Existeixen diferents procediments per a l'eliminació de la contribució de la línia de base. La majoria de mètodes clàssics es basen en l'ajust lineal o polinòmic de la línia de base. Aquests mètodes resulten poc eficaços, ja que el tipus de línia de base irregular mostrat és difícil d'ajustar correctament amb aquest tipus de models. Per primer cop s'ha adaptat el mètode d'ajust per a mínims quadrats asimètrics (*Asymmetric least-squares*) per a la correcció de la línia de base d'imatges hiperespectrals.

AsLS és un algoritme de correcció de línia de base sofisticat, capaç de corregir línies de base amb formes irregulars i que varien d'intensitat i de forma en els diferents píxels de la imatge¹⁵. En un principi, l'algoritme d'Eilers va ser proposat per a la correcció de la línia de base present en els cromatogrames. Els pics cromatogràfics són pics estrets que presenten una gran diferència de freqüència amb la contribució de línia de base, contínua i arrodonida. La diferència de freqüència entre el tipus de senyal de dispersió Raman i de la contribució fluorescent és anàloga a la dels cromatogrames. L'algoritme de correcció AsLS s'ha aplicat espectre per espectre a la imatge Raman.

El mètode AsLS es basa en un ajustament iteratiu de tot l'espectre mitjançant una línia de base. En la primera iteració, tots els canals espectrals tenen el mateix pes en l'ajust, amb la qual cosa una part de l'espectre queda per sobre de l'ajustament de la línia de base i una altra part per sota. Als canals espectrals per sobre de la línia d'ajustament, és a dir, a aquells canals on hi ha una banda d'absorció, se'ls dóna menys pes en la pròxima iteració de l'ajustament i així successivament. Després d'un nombre petit de cicles iteratius, no es produeix cap més variació i la línia de base ajustada es resta de l'espectre original per a obtenir l'espectre corregit.

Aquest algoritme es basa en l'ús del filtre de Whittaker¹⁶ que minimitza la següent equació^{15,17}:

$$Q = \sum_i v_i (y_i - f_i)^2 + \lambda \sum_i (\Delta^2 f_i)^2 \quad \text{Equació 4.1}$$

On \mathbf{y} és l'espectre, \mathbf{f} és l'ajust de la línia de base ajustada i \mathbf{v} són els pesos que es donen als valors d'intensitat dels canals espectrals de cada espectre. El paràmetre λ fa referència a la suavització de l'ajust. Valors elevats de λ impliquen un ajust més lineal; en canvi, valors més baixos generen

línies de base que s'apropen a l'estructura natural de la contribució del soroll de fons. Es considera que $v_i = p$ si $y_i > f_i$ (residual positiu) i $v_i = 1 - p$ quan $y_i \leq f_i$ (residual negatiu). P és el pes que es dóna als valors de l'espectre que presenten residual positiu i $1 - p$ als que tenen residual negatiu. Els valors de p van de 0 a 1.

En la figura 4.2.1.1.1 es poden veure els espectres del càlcul renal (A) abans i després d'aplicar la correcció de línia de base per mínims quadrats asimètrics.

La correcció de línia de base per mínims quadrats asimètrics també és particularment adequada per a les imatges FT-IR de mostres biològiques. A mode d'exemple es mostren en la figura 4.2.1.1.2 els espectres de la cèl·lula HeLa abans i després d'aplicar l'algoritme AsLS. En aquest cas, l'algoritme es va aplicar en dues regions espectrals (zona A i zona B) per separat. Els paràmetres d'ajust λ i p van ser optimitzats per a cadascuna de les zones.

AsLS va mostrar una eficàcia superior a altres mètodes proposats per a la supressió de la dispersió Mie, com l'extensió de la correcció multiplicativa de la dispersió (EMSC)¹⁸ proposada per Kohler et al¹⁹.

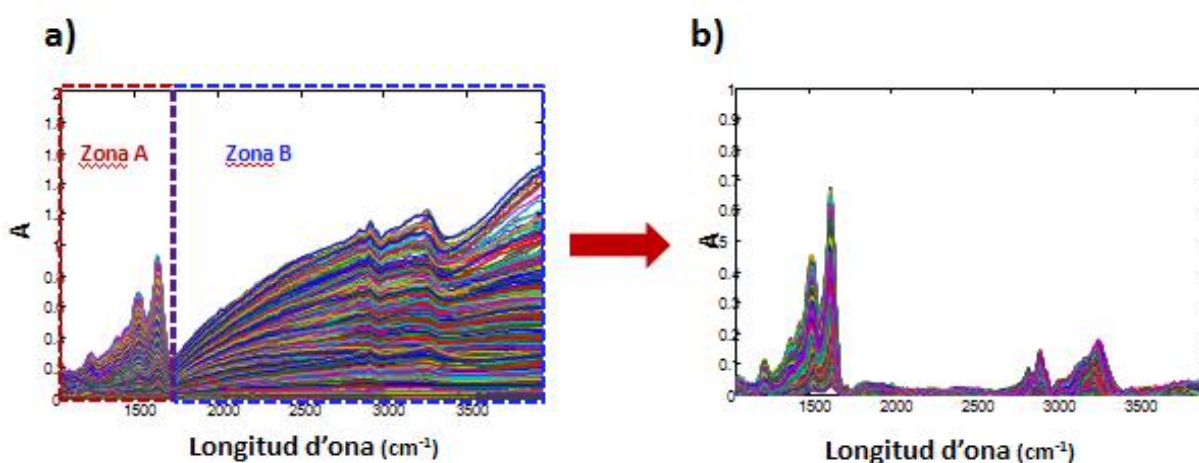


Figura 4.2.1.1.2 a) Espectres originals d'una cèl·lula HeLa, b) Espectres de la cèl·lula HeLa després de la correcció per separat de les dues zones espectrals (A i B) de la línia de base mitjançant AsLS.

Correcció Multiplicativa de la Dispersió (MSC)

El senyal espectral registrat amb la tècnica d'infraroig proper (NIR) es pot distorsionar per l'efecte de la dispersió de la llum, causat per la diferent mida i forma de les partícules sòlides de la mostra (*scattering*). Aquesta distorsió del senyal, relacionada amb les propietats físiques de la mostra i que es tradueix per la presència d'una línia de base lineal superposada al senyal NIR, és, en general, de nul·l interès en l'estudi de mostres químiques i de la seva composició. A continuació es descriu uns dels algorismes més emprats per a la reducció i eliminació de la distorsió del senyal deguda a la dispersió, denominat correcció multiplicativa de la dispersió, MSC (*Multiplicative Scatter Correction*)²⁰.

Aquest mètode, proposat per Geladi i col·laboradors, és molt utilitzat en espectroscòpia NIR, en mesures de reflectància. L'efecte de la dispersió es manifesta en la mesura NIR fent que la forma bàsica (química) de l'espectre NIR es vegi modificada per l'addició d'una contribució que pot ser descrita com una línia de base recta, de pendent i ordenada diferents segons les propietats físiques del píxel mesurat. En MSC, aquestes línies de base es corregeixen respecte a un espectre de referència. En el nostre cas, l'espectre de referència triat és l'espectre medià de la imatge. L'espectre medià és un espectre representatiu del conjunt de dades, que s'obté a partir de les medianes de les lectures espectrals als diferents canals espectrals. Es tria l'espectre medià i no el mitjà (obtingut amb les mitjanes de valors) per a evitar l'efecte de les lectures espectrals procedents de píxels anòmals. En MSC, s'assumeix que l'espectre d'un píxel i (s_i) pot ser descrit com:

$$s_i = a_i s_{\text{ref}} + b_i$$

Equació 4.2

on s_{ref} és l'espectre de referència (s_{ref}) i a_i i b_i , el pendent i l'ordenada de la recta, que són diferents en cada píxel, ja que l'efecte de la dispersió també ho és. L'espectre corregit per MSC s'obté fent:

$$S_{iMSC} = \frac{s_i - b_i}{a_i}$$

Equació 4.3

El principal inconvenient de MSC és que si el conjunt d'espectres originals és modificat, l'espectre de referència canvia, de manera que la correcció s'ha d'efectuar novament.

En la figura 4.2.1.1.3a es poden observar els espectres originals NIR de la imatge obtinguda a partir d'una mescla ternària d'àcid acetilsalicílic, cafeïna i midó. En la figura 4.2.1.1.3b es mostren els espectres NIR després de la correcció multiplicativa de la dispersió, on la forma de les bandes amb informació química s'aprecia molt més clarament.

Tot i que hi ha altres pretractaments aplicats a espectres NIR, tals com l'ús d'espectres derivats o l'autoescalat dels espectres (SNV)^{21,22}, s'ha preferit triar MSC perquè els espectres corregits preserven característiques interessants de les dades originals, com el fet que siguin positius, propietat útil quan s'apliquen restriccions en mètodes de resolució multivariant (vegeu secció 4.4).

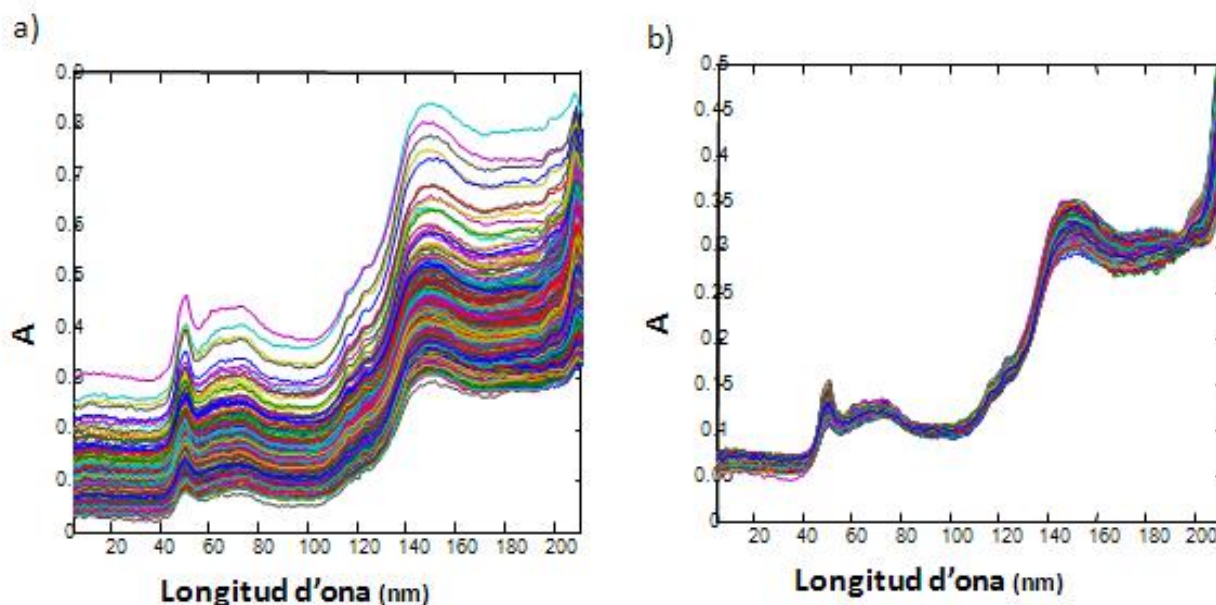


Figura 4.2.1.1.3 a) Espectres originals de la mescla ternària d'àcid acetilsalicílic, cafeïna i midó, b) Espectres de la mescla ternària d'àcid acetilsalicílic, cafeïna i midó després d'aplicar el mètode MSC.

4.2.1.2 Suavitatzat i eliminació de mesures anòmales

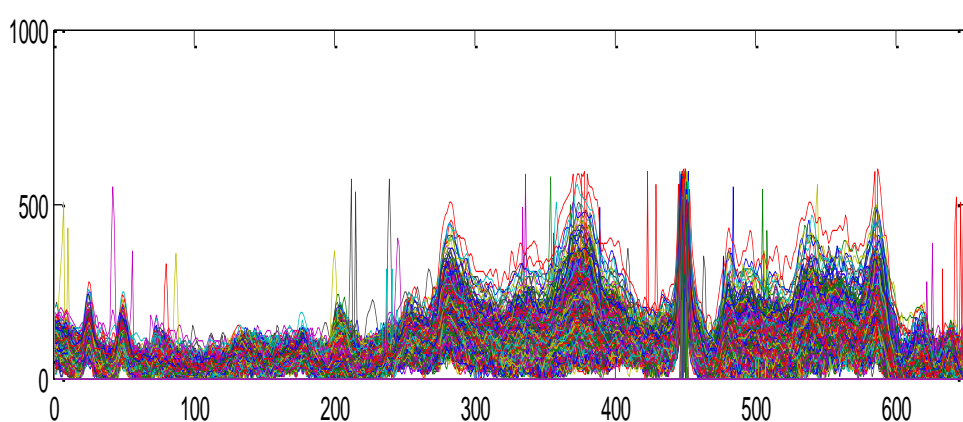
El suavitzat és un pretractament opcional orientat a disminuir el soroll aleatori que inclouen els senyals espectrals. Cal una certa precaució a l'hora d'aplicar aquest tractament perquè la qualitat de la mesura millora quan el soroll és eliminat, però l'ús excessiu de suavitzat pot causar pèrdues d'informació ja que canvis molt subtils en les formes de les bandes espectrals poden ser eliminats.

Per suavitzar els espectres d'una imatge es poden utilitzar diferents algorismes, entre els que podem destacar el filtrat de Savitzky-Golay²³, que garanteix l'augment de la relació senyal-soroll sense causar distorsions addicionals en el senyal spectral.

El filtrat de Savitzky-Golay treballa substituint els valors mesurats en un espectre per valors que procedeixen de l'ajust polinòmic efectuat sobre una finestra que conté la mesura d'interès i els valors veïns a dreta i esquerra. El principal avantatge d'aquesta aproximació és que conserva característiques de la distribució inicial com els mínims i màxims relatius, així com l'amplada dels

pics. És necessari definir dos paràmetres en el filtrat de Savitzky-Golay: el nombre de coeficients de convolució (mida de finestra) i el grau del polinomi d'ajust. Com menor és el grau de polinomi i major el nombre de coeficients de convolució, més suavitzades queden les dades^{24,25}. La figura 4.2.1.2.1 mostra els espectres Raman d'un teixit limfàtic sa abans i després de ser corregits mitjançant l'algoritme AsLS i suavitzats mitjançant el filtre de Savitzky-Golay amb un polinomi de segon grau ajustat a 9 punts (mida de finestra).

a)



b)

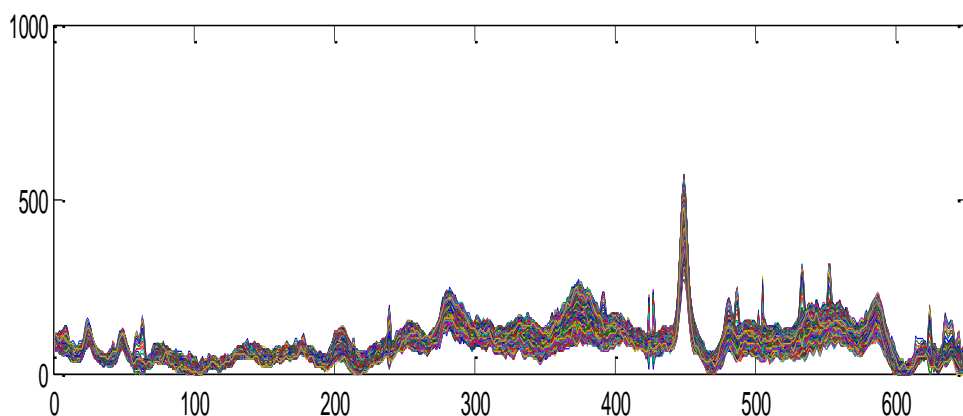


Figura 4.2.1.2.1 a) Espectres originals Raman d'una secció de teixit limfàtic. **b)** Espectres Raman de la secció del teixit limfàtic corregits mitjançant AsLS i suavitzats mitjançant el filtre de Savitzky-Golay.

Altres mètodes, com l'anàlisi de components principals (PCA)⁷, també són emprats per a la suavització del senyal espectral. L'anàlisi de PCA descompon les dades originals en variables

latents mitjançant un model bilineal ²⁶. Les primeres variables latents estan relacionades amb la variació química i la resta amb el soroll. La reproducció de les dades a partir de les primeres variables latents (les més rellevants) és un bon pretractament per a suavitzar les dades ¹.

A més del soroll experimental, les imatges hiperespectrals també pateixen els efectes de defectes físics en els sensors de mesura que generen píxels defectuosos que deixen passar massa llum i saturen el detector (*hot pixels*) o bé que no registren cap tipus de senyal (*dead pixels*)^{27,28}. La presència d'aquests píxels anòmals distorsiona els resultats obtinguts de l'anàlisi de la imatge, per tant han de ser detectats i eliminats o corregits. Una manera senzilla i fàcil d'identificar mesures anòmales és mitjançant l'ús de llindars que detectin intensitats espectrals globals o bandes espectrals que es trobin significativament per sobre o per sota d'un valor de referència. El llindar de referència pot ser definit com un múltiple o submúltiple de la mediana dels valors d'una banda espectral o de l'espectre medià d'una regió d'interès (ROI). Es desaconsella l'ús de la mitjana, ja que es pot veure influenciada per mesures anòmales ²⁷.

Com a mesura puntual anòmala en un espectre Raman es troben també els pics còsmics. Els pics còsmics són pics molt estrets i d'intensitat molt elevada que apareixen en posicions aleatòries en l'espectre Raman. Aquests pics son substituïts pel valor interpolat que s'obté de les mesures no anòmales dels canals espectrals veïns. Aquest mètode també es pot aplicar per al reemplaçament d'espectres de píxels defectuosos (*hot pixels* i *dead pixels*) per interpolació dels espectres veïns no anòmals en les dues direccions espacials de la imatge.

Els mètodes descrits de suavitzat i de correcció o eliminació de mesures anòmales poden aplicar-se a imatges adquirides per espectroscòpia Raman i d'infraroig de diferents tipus de mostres, sempre amb la precaució de no perdre informació, sinó de millorar la qualitat de les dades sense provocar distorsions en el senyal que condueixin a una mala interpretació dels resultats.

4.2.2 Tractament de la imatge

A continuació es presenten diverses transformacions importants per a l'anàlisi de la imatge. Aquestes resulten fonamentals ja que són la base per a una bona interpretació i representació dels resultats. Es descriuen diferents mètodes per a la compressió i per a efectuar canvis de rotació i translació de la imatge.

4.2.2.1 Compressió de la imatge

Les imatges hiperespectrals, com ja s'ha esmentat prèviament, són mesures que donen lloc a grans conjunts de dades. Per aquesta raó, sovint les imatges necessiten ser comprimides, tot i que cal mantenir-ne la informació rellevant, per tal de facilitar el seu emmagatzematge i anàlisi posterior.

La compressió d'una imatge es pot dur a terme tant en la direcció espectral com en l'espacial i un dels procediments més senzills i sovint utilitzat és el *binning*. El terme *binning* significa sumar lectures d'un interval de canals espectrals veïns per a formar una sola mesura (compressió espectral) o també sumar espectres de píxels veïns per a formar una sola mesura (compressió espacial). La tria de la direcció de la compressió dependrà de la resolució de la imatge i de la informació preferent per al tipus d'anàlisi. Quan la compressió es fa mantenint la informació espectral o espacial rellevant, la qualitat dels resultats obtinguts després de l'anàlisi de la imatge és la mateixa que si s'usa la imatge original. Representacions comprimides de les imatges poden ser obtingudes emprant altres mètodes, com és el PCA. En aquest cas, els canals espectrals originals es troben representats per un petit nombre de variables (components principals), les quals són combinacions lineals dels canals espectrals originals que expressen la informació de manera molt eficient, ja que són ortogonals entre ells ²⁹.

Una altra manera fàcil de reduir el temps d'anàlisi és seleccionar un nombre reduït de píxels o canals espectrals. La selecció es pot dur a terme tant en la direcció espectral com en l'espacial, però cal assegurar-se de que sigui representativa de la informació de la imatge global.

En aquesta tesi, s'han dut a terme procediments de *binning* en la direcció espectral per al cas de les imatges Raman (passant de 1550 canals originals a 775), en la direcció espacial per al cas de l'acoblament d'imatges d'una mescla de productes farmacèutics de diferent resolució espacial i s'han seleccionat regions espacials de les imatges NIR (ROI, regions d'interès) en lloc d'utilitzar la imatge total. Els exemples anteriorment esmentats s'exposaran en l'apartat de resultats i discussió (secció 5).

4.2.2.2 Transformacions espacials de la imatge

Les transformacions espacials de la imatge es basen en moviments de translació (en la direcció x i/o y de les coordenades espacials d'un píxel) i moviments de rotació.

Les transformacions espacials són importants en situacions en què imatges recollides sobre la mateixa mostra amb diferents plataformes espectroscòpiques es volen tractar conjuntament. En aquest cas cal que els píxels comparats de les imatges siguin equivalents i per això cal realitzar rotacions o translacions respecte una imatge presa com a referència.

Les imatges es transformen per a ser congruents prenent com a base una imatge sencera o certs píxels de referència. Existeixen diferents procediments que proporcionen eines per a dur a terme aquesta operació, per exemple, la *Tolbox Image Preprocessing* del programa Matlab fa congruents automàticament parelles d'imatges a partir de la selecció manual de punts de referència en les dues imatges o mitjançant la comparació de pautes d'intensitat relativa. Aquest mètode s'adapta bé a imatges espacialment molt ben estructurades, com són les imatges obtingudes per sensors remots, on els elements ambientals que les formen (sòl, plantes...) són perfectament identificables. Però sovint en les imatges químiques Raman i d'infraroig, la visualització dels punts de referència equivalents entre imatges no és tan simple i cal usar tota la imatge per a fer aquestes operacions.

Existeixen diferents procediments i eines per a la compensació de les diferències espacials de translació i rotació entre imatges^{30,31}. En aquesta tesi s'ha desenvolupat un procediment per a compensar les diferències espacials entre imatges provinents de diferents tècniques

espectroscòpiques (vegeu secció 5.4). En aquest procediment es troben implicades operacions de translació i rotació junt amb l'optimització dels seus paràmetres. Les operacions de rotació i translació es troben ja implementades en la *Tolbox Image Preprocessing* del Matlab. L'operació de rotació gira la imatge θ graus en el sentit de les agulles del rellotge respecte el seu punt central, mentre que l'operació de translació mou la imatge respecte la imatge de referència en les direccions x i y . L'avantatge que presenta el procediment desenvolupat es que utilitza tots els píxels de la imatge i evita la selecció de píxels equivalents entre imatges, tasca complicada en imatges químiques que procedeixen de tècniques espectroscòpiques diferents. Aquest nou procediment s'explicarà en detall a la secció 5.4.

4.3 ANÀLISI EXPLORATÒRIA DE LA IMATGE

El principal objectiu en l'anàlisi de les imatges hiperespectrals és la identificació (caracterització) i coneixement de la distribució espacial dels components de la mostra. Atesa l'estructura bilineal pròpia de les imatges hiperespectrals, la majoria de les eines quimiomètriques aplicades en l'anàlisi d'imatges es basen en l'ús d'aquest tipus de model matemàtic (vegeu figura 4.1.1).

L'anàlisi exploratòria és una anàlisi inicial de la imatge que ens aporta un coneixement sobre l'estructura interna i complexitat de la imatge. A continuació, es fa una descripció detallada dels mètodes i algoritmes d'exploració emprats en aquesta tesi.

4.3.1 Anàlisi de components principals

Els mètodes d'anàlisi multivariant de la imatge (MIA) empren tota la informació continguda en la imatge original i permeten reduir la complexitat de la imatge i conèixer la seva estructura interna^{4,6,19}. Sovint els mètodes d'anàlisi multivariant s'associen a l'anàlisi de components principals. L'anàlisi de components principals permet obtenir un model bilineal abstracte que explica la variació experimental observada en la imatge utilitzant el mínim nombre de components possible

³². L'anàlisi per components principals descompon matemàticament la matriu de dades experimentals **D** en el producte de dues matrius **T** i **P^T**:

$$\mathbf{D} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

Equació 4.4

On **T** és la matriu d'*scores* i **P^T** és la matriu de *loadings*. **E** és la matriu de residuals. Aquesta descomposició matemàtica es realitza sota restriccions de màxima variància explicada i ortogonalitat. A la pràctica, aquesta descomposició es troba a partir del càlcul de vectors i valors propis de la matriu de covariància de **D**. En l'anàlisi per components principals, els factors s'ordenen en ordre descendent en funció de la variància que són capaços d'explicar. Per tant, el primer component està associat amb el valor propi més gran i explica el percentatge més gran de variància. El segon component explica el segon percentatge de variància més gran no descrit pel primer component i així successivament.

La matriu de *scores* conté informació de com les mostres (en aquest cas píxels) estan relacionats uns amb els altres, mentre que els *loadings* informen de la relació existent entre les variables espectrals. L'expressió matemàtica en forma matricial del model de PCA (equació 4.4) i de la llei de Lambert Beer, **D=CS^T+E**, són formalment idèntiques. La diferència es troba en què el model químic necessita tants espectres purs com constituents presents en la imatge per tal de poder reproduir l'espectre de qualsevol píxel, mentre que el model de PCA usa tants components principals (abstractes) com constituents de la mostra per a reproduir la matriu original de dades. Per tant, el nombre d'espècies químiques d'una imatge és igual al nombre de components principals necessari per a descriure la màxima variància de les dades. De fet, les files de la matriu de *loadings* (**P^T**) podrien ser interpretades com espectres abstractes i les columnes de la matriu d'*scores* (**T**) poden ser replegades convenientment per tal d'obtenir els mapes abstractes de distribució (de manera anàloga als perfils de concentració **C** en la figura 4.3.1.1)¹. La figura 4.3.1.1 mostra els resultats obtinguts pel model de PCA i el model químic real d'una imatge d'una emulsió adquirida mitjançant microscòpia Raman³³. L'emulsió està constituïda per quatre constituents, que corresponen a la gota, la interfase, l'additiu i la fase externa a la gota. Els mapes de *scores* són similars als mapes de distribució real i les bandes espectrals més rellevants dels espectres purs concorden amb les variables més rellevants dels *loadings*. Tot i així, es poden

observar diferències entre els dos models. Quan comparem els espectres purs i els *loadings*, la principal diferència és la manca de sentit químic dels *loadings*, ja que presenten bandes negatives que no existeixen en els espectres Raman originals. També trobem valors negatius en els mapes de *scores*, inadmissibles quan es parla de concentracions químiques reals. Això és degut a que la correlació entre components principals ha de ser nul·la, condició que no obeeixen els espectres purs reals. Aquesta és la raó per la qual els components principals no poden ser directament relacionats amb els components químics reals de la imatge, ja que les propietats matemàtiques i les propietats químiques dels perfils són diferents en ambdós models.

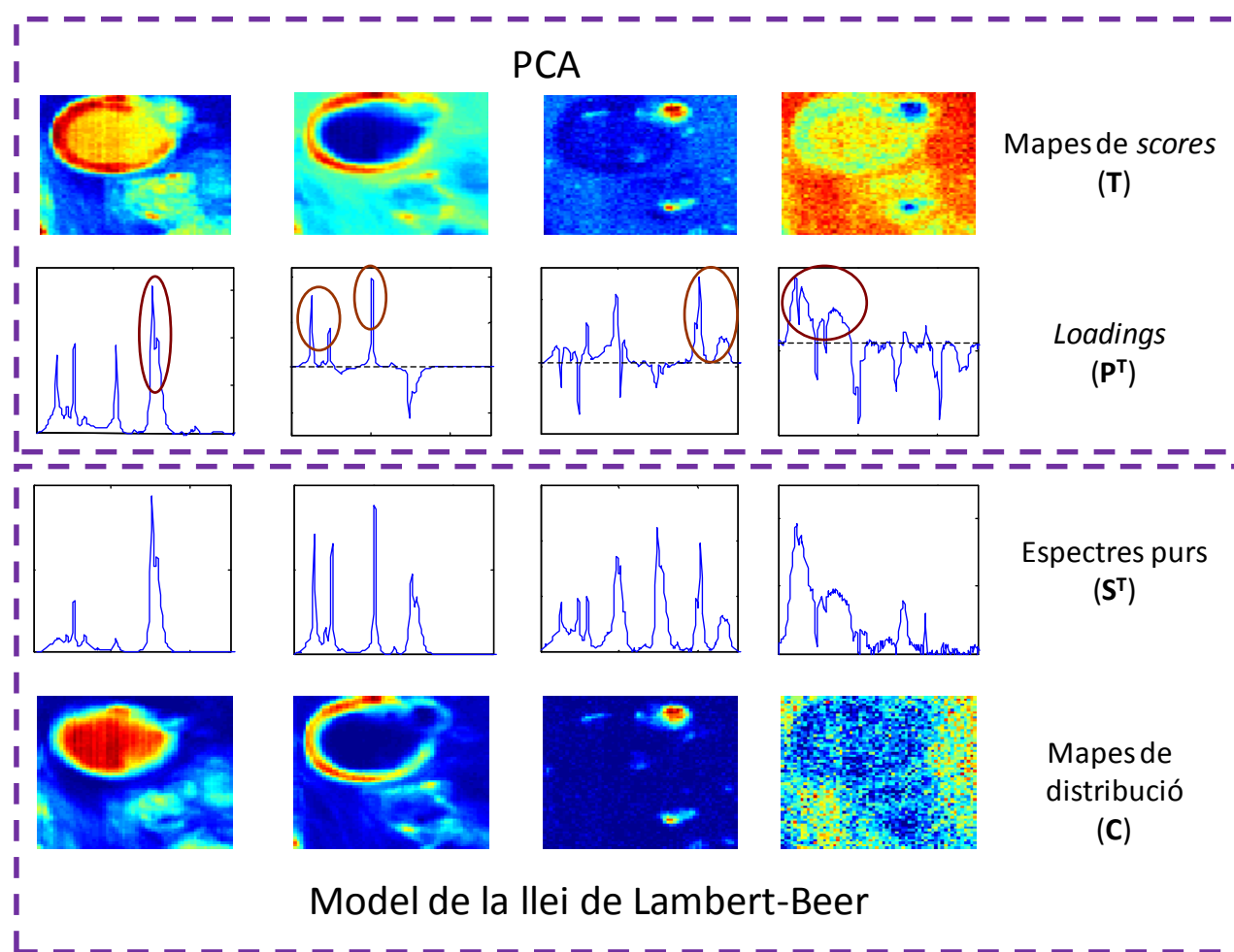


Figura 4.3.1.1. Anàlisi de PCA i model de la llei de Lambert-Beer d'una imatge d'una emulsió obtinguda mitjançant microscòpia Raman. Reproduïda del llibre corresponent a la referència 1.

Tot i que no és fidel al model químic, l'anàlisi de PCA d'una imatge és sempre útil per a una exploració prèvia de les dades. Com ja s'ha vist els *loadings* indiquen els canals espectrals més

rellevants i la representació dels *scores* ajuda a localitzar les zones corresponents a les variables relacionades amb els *loadings*. A més l'anàlisi de PCA proporciona una idea sobre el nombre de constituents presents en una imatge, ja que el nombre de components principals necessari per a explicar la màxima variància de les dades és igual al nombre d'espècies químiques presents en la mostra analitzada. Per a l'anàlisi de components principals s'ha fet servir l'algoritme de descomposició en valors singulars SVD (*Singular value decomposition*). Segons SVD, la matriu de dades es descompon en:

$$\mathbf{D}_{(m,n)} = \mathbf{U}_{(m,n)} \mathbf{S}_{(nc,nc)} \mathbf{V}_{(nc,n)}^T \quad \text{Equació 4.5}$$

On \mathbf{U} , i \mathbf{V}^T són les matrius de *scores* i *loadings* normalitzats, respectivament, i \mathbf{S} és una matriu on els elements de la diagonal són els valors singulars de cada component. Els valors singulars són l'arrel quadrada de valors propis. La representació gràfica dels valors singulars és una manera fàcil i intuïtiva d'obtenir una primera aproximació del nombre de components necessari per a explicar la variació química de la imatge original.

El nombre de components necessari per a descriure una imatge és determinat per inspecció visual del gràfic de valors singulars. Valors singulars grans s'associen a contribucions químiques rellevants mentre que valors petits i iguals es relacionen amb el soroll.

4.3.2 Mètodes de detecció de les variables més pures

Existeixen diferents mètodes exploratoris capaços de localitzar els canals espectrals o els píxels més purs en les dades originals de la imatge³⁴. Un dels mètode d'anàlisi exploratòria més utilitzats és el SIMPLISMA (Simple-To-Use Interactive Self Modelling Analysis)^{34,35}, en que s'ha basat aquesta tesi per a determinar els espectres més purs de la imatge. Aquest mètode es basa en seleccionar les files (espectres) o columnes (canals espectrals) més diferents entre ells de la matriu de dades \mathbf{D} (vegeu figura 4.3.2.1), d'acord amb un criteri predeterminat de mesura de la puresa.

Cada fila o columna de la matriu de dades **D** està formada per les contribucions d'un o més components. La puresa d'una variable i , (p_i) relativa a una fila o una columna queda definida per la seva desviació estàndard relativa que es pot calcular segons la següent equació:

$$p_i = \frac{s_i}{m_i + f_i} \quad \text{per } i = 1, \dots, m \text{ files o columnes} \quad \text{Equació 4.6}$$

on p_i és la desviació estàndard relativa, s_i la desviació estàndard i m_i la mitjana i f_i és un factor que té en compte el percentatge de soroll de les dades per a una determinada fila o per a una determinada columna i . La integració del factor del soroll (f_i) permet prevenir la selecció de soroll de fons com a variable pura.

El procediment comença trobant la fila o columna amb la major desviació estàndard relativa (màxima puresa) definida en l'equació 4.6. La primera variable pura seleccionada és la que presenta major puresa relativa. Seguidament, es procedeix a la normalització d'aquesta fila o columna i es recalculen les pureses relatives de cadascuna de les altres variables segons la següent equació:

$$p'_i = w_i \times p_i \quad \text{Equació 4.7}$$

On w_i és un factor de ponderació que té en consideració la dissimilitud del píxel analitzat amb el píxel més pur prèviament seleccionat (menys correlació entre variables, més gran és el factor de ponderació). La segona variable triada presentarà el valor més gran de puresa relativa recalculada. Per a la selecció de cada nova variable es recalcularà el pes w_i i la puresa segons l'equació 4.7. El coneixement previ del nombre de components no és necessari ja que el procés de selecció finalitza quan la informació de l'última variable triada és molt similar a l'anterior. Si es treballa en la direcció dels píxels s'obtenen els espectres més purs, i si es treballa en la direcció espectral s'obtenen els canals espectrals més purs a partir dels quals es poden representar els mapes de distribució més purs.

En la figura 4.3.2.1 es mostra l'aplicació del mètode SIMPLISMA en la imatge de l'emulsió amb quatre components (la gota, la interfase, l'additiu i la fase externa a la gota). En la figura 4.3.2.1 ,

a-d són els píxels més purs seleccionats en la imatge i els seus respectius espectres es mostren a l'esquerra de la figura. Els canals espectrals purs seleccionats es troben etiquetats del 1 al 4. Els mapes de distribució es recuperen replegant cada columna del canal spectral pur corresponent segons l'estructura bidimensional de la imatge original (vegeu inferior de la figura 4.3.2.1).

Els píxels seleccionats (a-d) es troben en zones associades als quatre components anteriorment descrits. Els canals espectrals 1-3 proporcionen els mapes de distribució de la gota, la interfase i l'additiu, però el mapa de distribució associat al canal spectral número 4 no representa correctament l'estructura de la fase externa a la gota. El canal número 4 tot i ser el canal spectral més representatiu per a la fase externa a la gota, presenta diferents contribucions corresponent a la mescla del senyal d'altres constituents, per aquesta raó el mapa de distribució no correspon a l'estructura del constituent. Aquest és un clar exemple on el mètode SIMPLISMA selecciona les variables més pures de la imatge original (espectre i mapes de distribució) que aporten una primer coneixement sobre les característiques dels components presents en la imatge. Tot i així, generalment aquestes variables no es poden associar amb els espectres i mapes purs de les espècies presents en la mostra perquè no sempre és possible la localització de píxels o canals spectral selectius per a cada un dels constituents. Independentment, la selecció de les variables més pures és una bona estimació inicial per als mètodes de resolució iteratius.

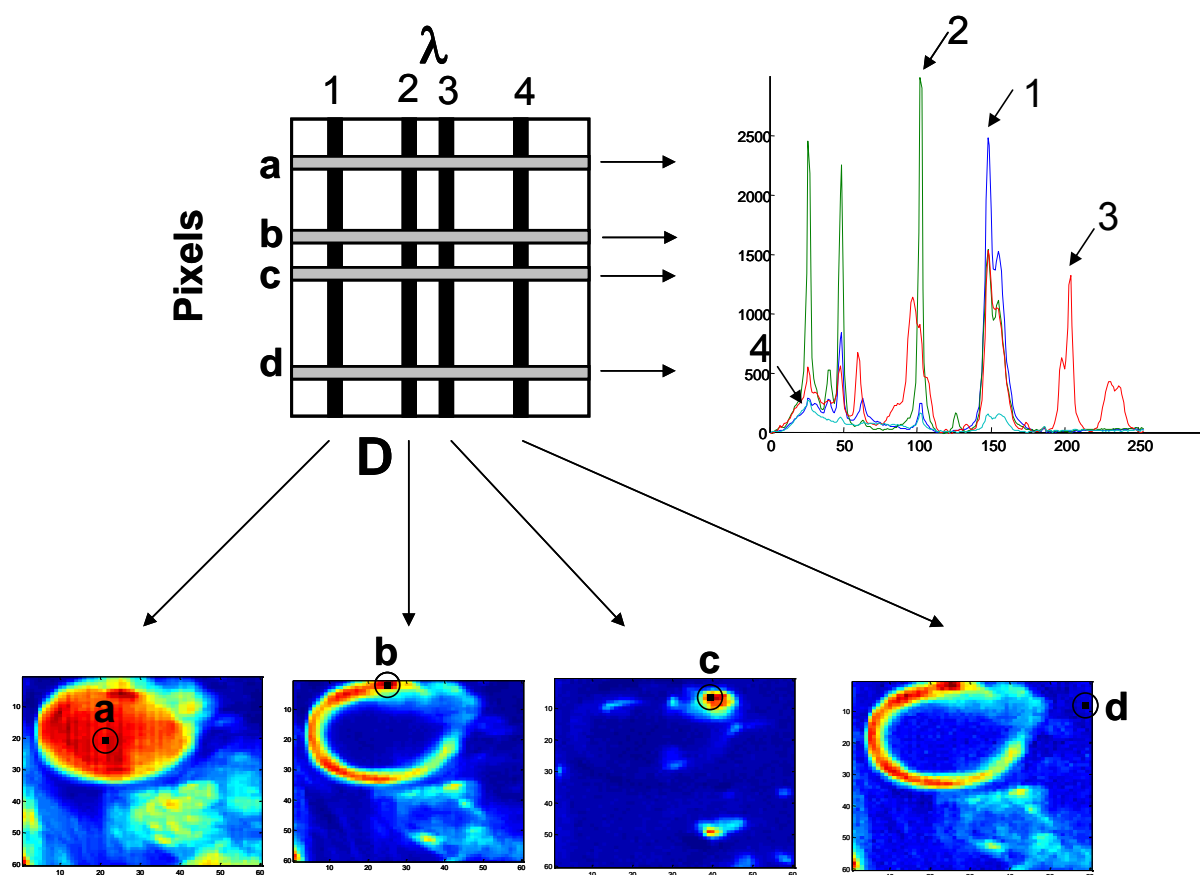


Figura 4.3.2.1 Anàlisi SIMPLISMA d'una imatge Raman d'una emulsió. Representació dels espectres dels píxels més purs (esquerra) i els mapes de distribució corresponents als canals espectrals més purs (inferior). Les lletres i els números en ambdues representacions assenyalen la localització dels píxels i els canals espectrals més purs respectivament. Reproduïda del llibre corresponent a la referència 1.

4.3.3 Anàlisi exploratòria de rang local en imatges (Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis)

Relacionat amb la importància de la presència de píxels i canals espectrals selectius, l'exploració local del grau de superposició dels constituents de la mostra en una superfície o volum escanejat proporciona informació que resulta de gran utilitat durant l'optimització del procés de resolució. El mètode FSIW-EFA (Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis) és una evolució de l'algoritme d'anàlisi de rang local anomenat anàlisi de factors emergents amb finestra mòbil de

mida fixa (FSMW-EFA)³⁶, particularment dissenyat per a l'estudi de la complexitat composicional dels píxels en la imatge.

En el mètode FSIW-EFA es duen a terme anàlisis PCA locals de manera exhaustiva sobre l'àrea formada per cadascun dels píxels de la imatge i els seus veïns fins que tota la superfície o volum de la imatge és escanejat. Les àrees analitzades contenen un píxel i el seus respectius veïns en les dues o tres dimensions de la imatge. La finestra de la imatge és definida per un nombre de píxels igual o poc superior al nombre total d'espècies presents en la imatge. D'aquesta forma, totes les possibles situacions de solapament dels constituents es poden trobar representades.

A partir del mètode FSIW-EFA s'obtenen els mapes de valors singulars (vegeu figura 4.3.3.1b) i els mapes de rang local. Els mapes de valors singulars conserven l'estructura espacial de la imatge i representen els valors singulars de cada àrea de píxel analitzada en la seva localització espacial. Es representa cada valor singular ($1r, 2n, 3r...$) per separat. Com en una anàlisi de PCA global, valors singulars alts impliquen la presència de components químics, en canvi valors baixos descriuen bàsicament el soroll experimental. Els mapes de rang local representen el nombre de components químics presents en cada píxel d'una imatge, és a dir, el seu rang local. Es deriven d'aplicar un valor llindar, que permet distingir entre valors singulars associats a un component químic o a soroll experimental.

Es poden diferenciar dos tipus de mapes de rang local: els mapes de rang local complet (vegeu figura 4.3.3.1c) i els mapes de rang local parcial (vegeu figura 4.3.3.1d). Els mapes de rang local complet representen el nombre de components químics present a cadascun dels píxels de la imatge. S'obtenen amb l'ajut d'un valor llindar que marca el límit entre contribucions químiques i soroll experimental. La selecció del valor llindar es fa per inspecció visual de gràfics de valors singulars. Els mapes de rang local complet tenen valor exploratori i donen una visió de la complexitat composicional de les diverses regions de la imatge. Per tal de minimitzar la subjectivitat de la selecció d'un valor llindar, els mapes de rang local parcial s'obtenen fent servir una banda llindar, amb límits superior i inferior, que reflecteixen valors que podrien ser triats raonablement com a llindar. Els mapes de rang local parcial només representen el rang d'aquells píxels que mostren un rang invariant entre el límit inferior i superior de la banda llindar. Els píxels

representats són el que proporcionen informació robusta i consistent de rang local. Aquesta informació és molt rellevant i s'utilitza en el procés de resolució de la imatge.

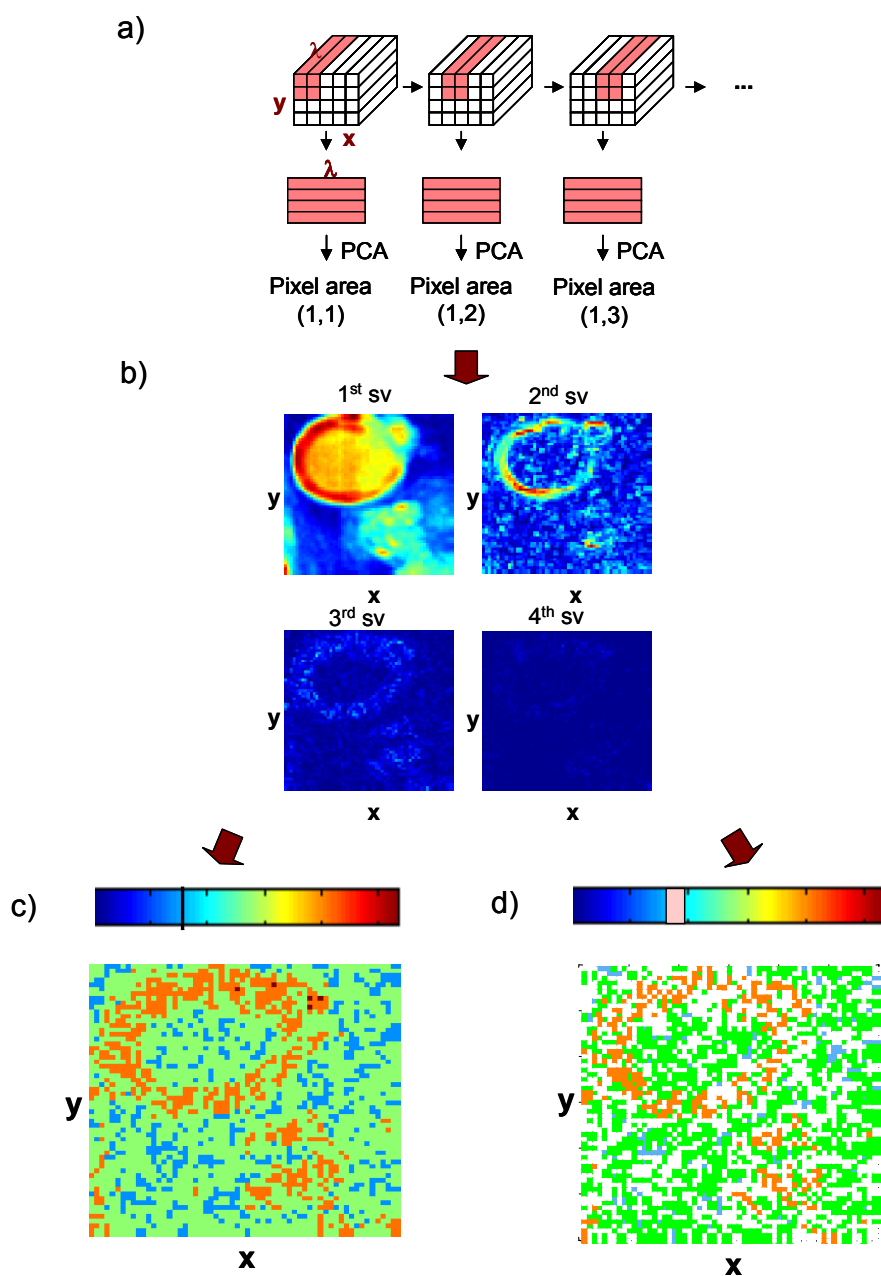


Figura 4.3.3.1 FSIW-EFA Modus operandi del mètode (imatge Raman d'una emulsió) **a)** Construcció de la finestra de píxels **b)** Mapes dels valors singulars provinents de les anàlisis locals de PCA **c)** Mapa de rang local complet **d)** mapa de rang local parcial.

4.4 RESOLUCIÓ D'IMATGES HIPERESPECTRALS. MÈTODE DE RESOLUCIÓ MULTIVARIANT DE CORBES PER MÍNIMS QUADRATS ALTERNATS (MCR-ALS)

Els mètodes de resolució multivariant són una eina recentment incorporada en l'anàlisi d'imatges hiperespectrals, però són els mètodes que s'ajusten amb més fidelitat al model real de la mesura espectroscòpica. Concretament, el mètode MCR-ALS (resolució de corbes per mínims quadrats alternats) descompon la matriu de dades originals en un model bilineal que descriu la variació de les dades de manera òptima i que està format per perfils de concentració (mapes de distribució) i espectres purs amb significat químic. Hi ha altres mètodes multivariants de resolució com per exemple l'anàlisi de components vèrtexs (VCA)³⁷ i d'altres algoritmes provinents del camp dels sensors remots³⁸. El seu objectiu també es basa en la descomposició lineal de la imatge original en els components químics més significatius. Toti que aquestes estratègies presenten un objectiu similar al del mètode MCR-ALS i sovint proporcionen resultats comparables, en aquesta tesi s'ha preferit l'algoritme iteratiu per mínims quadrats alternats perquè és un mètode molt flexible que permet seleccionar i aplicar restriccions en el model i treballa amb una o diverses imatges conjuntament.

L'objectiu del mètode MCR-ALS³⁹⁻⁴¹ és la descomposició de la matriu de la imatge original (**D**) en els perfils de concentració (matriu **C**) i els espectres purs (matriu **S^T**) dels constituents presents en la imatge (vegeu figura 4.1.1).

Per a la resolució mitjançant MCR-ALS, només cal tenir en compte com a informació de partida la imatge obtinguda. El mètode assumeix el model bilineal de l'equació 4.8 i consta de les següents etapes generals:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$$

Equació 4.8

- 1) Determinació del nombre de components presents en la imatge original **D**.
- 2) Elaboració d'una estimació inicial de la matriu **C** o **S^T**.
- 3) Optimització del càlcul de les matrius **C** i **S^T** per mínims quadrats sota restriccions fins que s'assoleix el criteri de convergència.

Amb l'ajut dels mètodes d'anàlisi d'exploració explicats en l'apartat anterior, es determina el nombre de components químics mitjançant l'anàlisi de components principals, amb l'algoritme de descomposició en valors singulars, SVD, i s'elaboren les estimacions inicials bé sigui dels perfils de concentració (**C**) o dels espectres dels constituents purs de la imatge (**S^T**) mitjançant un mètode de selecció de variables pures similar al SIMPLISMA (Simple-to-use interactive self modelling analysis) ³⁴ (vegeu secció 4.3). En la resolució d'imatges, la selecció d'espectres com estimació inicial és més comuna, ja que es pot tenir un coneixement previ d'alguns constituents presents en la imatge (i, conseqüentment dels seus espectres purs), i quan no hi ha coneixement previ, és més habitual l'existència de píxels selectius que s'associen a l'espectre pur d'un component, que de canals espectrals selectius.

Les operacions $\mathbf{C}=\mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ i $\mathbf{S}^T=(\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$ estan involucrades en l'últim pas del procediment d'optimització per mínims quadrats alternats. En la primera iteració, la matriu **C** (o **S^T**) conté les estimacions inicials dels perfils de concentració o dels espectres. En els cicles següents, les matrius de partida en el càlcul per mínims quadrats són les obtingudes en la iteració anterior. El final del procés es dona quan el producte dels perfils de concentració i dels espectres resolts (**CS^T**) reproduïx la matriu original de manera satisfactòria. Els paràmetres que s'utilitzen per a valorar la qualitat de l'ajust del model obtingut són:

- a) La manca d'ajust del model (lack of fit)

$$\text{Lof (\%)} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{i,j}^2}{\sum_{i,j} d_{i,j}^2}}$$

Equació 4.9

- b) El percentatge de variància explicada

$$R^2 = \left(\frac{\sum_{i,j} d_{ij}^2 - \sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2} \right) \times 100$$

Equació 4.10

c) i la desviació estàndard dels residuals

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{nfiles \cdot ncolumnes}}$$

Equació 4.11

on d_{ij} és l'element de la matriu de les dades originals a la fila i i la columna j i e_{ij} és el residual relacionat, que resulta de la diferència entre l'element d_{ij} de les dades originals i l'anàleg reproduït amb el model MCR-ALS. $Nfiles$ i $ncolumnes$ són el nombre de files i el nombre de columnes de la matriu original \mathbf{D} , respectivament. Existeixen diferents criteris que marquen el punt final del procés d'optimització, com per exemple, que la variació del percentatge de l'ajust de les dades entre cicles consecutius no superi un valor llindar (per exemple, 0,1%) o que el procés d'optimització s'aturi quan s'arriba a un nombre de cicles iteratius predeterminat.

El *lack of fit* és el paràmetre que indica la falta d'ajust del model. La incertesa del model es troba relacionada amb l'error experimental de les dades. Per defecte no existeix un valor òptim de la manca d'ajust, ja que depèn de la qualitat de les dades originals, però quan el valor del *lack of fit* és més gran del que cal esperar, una opció és provar models amb un nombre creixent de components i observar com el nombre de components afecta l'ajust del model. Si la manca d'ajust millora, això significa que el primer model no tenia la suficient informació per descriure de manera completa el sistema. En canvi, si el model empitjora o no varia significa que l'addició de components al sistema és innecessària.

Els perfils de concentració i els espectres purs obtinguts en l'anàlisi d'una imatge amb MCR-ALS poden no ser els vertaders a causa de l'existència d'ambigüitats en la resolució^{1,42-44}. Es diu que hi ha ambigüitat quan parelles diferents de matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T poden reproduir la matriu de dades original \mathbf{D} amb un ajust òptim.

Els dos tipus principals d'ambigüitat associats als mètodes de resolució multivariant de corbes són l'ambigüitat d'intensitat i l'ambigüitat rotacional. Es diu que hi ha ambigüitat d'intensitat o escala quan existeixen diferents solucions possibles de perfils de concentració i espectres purs (\mathbf{c}_i i \mathbf{s}_i^T) amb la mateixa manca d'ajust i la mateixa forma, però reescalats per un factor desconegut k_i

(veure equació 4.12). Aquesta ambigüitat se suprimeix amb l'aplicació de la normalització dels espectres resolts.

$$\mathbf{D} = \sum_i \mathbf{c}_i \mathbf{s}_i^T = \sum_i (k_i \mathbf{c}_i) \left(\frac{1}{k_i} \mathbf{s}_i^T \right) \quad \text{Equació 4.12}$$

Per altra banda, es diu que hi ha ambigüitat rotacional quan diferents parelles de matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T , que mostren perfils amb formes diferents, poden reproduir la matriu original \mathbf{D} de manera òptima. Això s'explica amb l'equació 4.13 on l'ús d'una matriu de transformació \mathbf{T} pot donar perfils de concentració i espectres purs (\mathbf{C}' i \mathbf{S}'^T) de forma diferent als perfils reals esperats.

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T = \mathbf{C}\mathbf{T}\mathbf{T}^{-1}\mathbf{S}^T = \mathbf{C}'\mathbf{S}'^T \quad \text{Equació 4.13}$$

El fenomen d'ambigüitat rotacional es dona quan que el sistema estudiat no compleix certes condicions de selectivitat i rang local ^{42,44,45}. A conseqüència d'aquestes ambigüitats, els espectres purs o perfils de concentració resolts per MCR-ALS seran combinació lineal dels autèntics espectres o perfils de concentració desconeguts.

Temps enrere, Manne va postular una sèrie de condicions que cal que compleixin els conjunts de dades per tal de resoldre sense ambigüitats els perfils de concentració i els espectres d'un compost en una matriu de dades ⁴⁶. Aquests teoremes van ser descrits per a dades estructurades de processos, però han estat adaptats per a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals tal i com s'especifica a continuació:

- a) Resulta possible l'obtenció d'un mapa de distribució d'un constituent quan tota la resta de components apareix en píxels on aquest constituent es troba absent.
- b) Resulta possible l'obtenció d'un espectre d'un constituent si els seus píxels no se superposen sempre amb els d'un altre constituent.

En resum, és possible l'obtenció de perfils de concentració i espectres purs sense ambigüitats quan cadascun dels constituents presents en una imatge es troba absent en alguns píxels i no apareix sempre associat a un altre constituent de la mostra.

La manera de reduir la incertesa dels resultats de MCR-ALS és mitjançant la introducció de restriccions durant el procés de resolució. Es pot descriure una restricció com una característica matemàtica o química que se sap que compleixen els perfils dels components purs del sistema. L'aplicació de les restriccions és opcional i flexible. Així, les restriccions aplicades a la matriu \mathbf{C} i la matriu \mathbf{S}^T poden ser diferents i qualsevol restricció pot ésser aplicada als perfils d'algunes o de totes les espècies químiques del sistema. A continuació es farà una breu descripció de les possibles restriccions que es poden aplicar durant el procés d'optimització d'ALS. Les restriccions aplicables a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals es descriuen a continuació:

No-negativitat

Aquesta restricció evita la presència de valors negatius als perfils. S'aplica a tots els perfils de concentració perquè les concentracions de les espècies químiques sempre han de ser iguals o més grans que zero. D'altra banda, també s'utilitza amb els espectres recollits amb tècniques espectroscòpiques que, per natura, proporcionen lectures espectrals positives^{39,47,48}. Quan s'aplica la restricció de no-negativitat, es reemplacen valors negatius dels perfils per valors nuls o valors positius molt petits.

Selectivitat i rang local

És una restricció que s'empra quan en una regió o element dels perfils de concentració o dels espectres purs se sap que només una espècie és present (selectivitat) o que alguna espècie és absent (rang local)⁴⁰. Un píxel és selectiu quan el seu valor respon a la presència d'un sol component o espècie química, i, per tant, el seu espectre correspon al d'un component pur. De la mateixa manera, quan un canal spectral és selectiu es pot obtenir el mapa de distribució del component pur relacionat. La informació de selectivitat o rang local en la direcció dels perfils de concentració s'obté mitjançant l'aplicació de mètodes de rang local, com l'anàlisi de factors

emergents de finestra mòbil, Fixed Size Moving Window-EFA ⁴⁹, o la seva variant adaptada a imatges FSIW-EFA, descrita en la secció 4.3.3.

Com ja s'ha dit anteriorment, l'anàlisi exploratòria mitjançant FSIW-EFA dóna una estimació del nombre de components presents a cadascun dels píxels de la imatge. El píxels que presenten absència d'algun dels constituents de la mostra en el mapa de rang local parcial poden ser objecte de restricció durant el procés de resolució. Tot i així, la sola informació que proporciona l'anàlisi exploratòria FSIW-EFA no permet la identificació dels components absents en els píxels a restringir. Per a dur a terme la identificació dels constituents absents, és necessari combinar la informació de rang local amb la d'espectres de referència dels components purs. Els espectres de referència ideals serien els espectres dels components purs, però no es coneixen en la majoria dels casos. Quan no es disposa dels espectres purs dels constituents es trien com espectres de referència una aproximació dels espectres purs. L'aproximació dels espectres purs es pot obtenir pels mètodes de selecció de variables pures o bé usant els espectres resolts en l'anàlisi MCR-ALS sota la restricció de no-negativitat.

Resumint, per a la introducció de la restricció de rang local en el procés de resolució és necessari:

- a) el mapa de rang local parcial (veure figura 4.4.1a) i b) els espectres purs (o una bona aproximació) per a cadascun dels constituents (veure figura 4.4.1b). El nombre de components absents a cadascun dels píxels (i) es calcula mitjançant la següent operació:

$$\text{n. de component absents (i)} = \text{rang total de la imatge} - \text{rang local del píxel (i)}$$

Per a la identificació dels components absents es calcula el coeficient de correlació entre l'espectre original del píxel d'interès i els espectres de referència de cadascun dels constituents presents en la imatge. Els constituents que presenten menor coeficient de correlació respecte l'espectre original del píxel són els constituents absents en aquell píxel. Aquest procediment es duu a terme individualment per a cadascun dels píxels a restringir. Per evitar possibles falses identifications, primer s'estudia la correlació natural entre els espectres de referència, i s'estableix que l'absència d'un component en un píxel es confirma quan el coeficient de correlació entre l'espectre del píxel i l'espectre de referència d'aquest component és igual o menor que el coeficient de correlació més gran entre els espectres purs de referència. Quan el

component absent és identificat sota els criteris imposats (veure figura 4.4.1c) es procedeix a la introducció d'aquesta informació en la restricció de rang local del píxel mitjançant una matriu *cse* de mida igual que la dels perfils de concentracions **C** (nombre de píxels x nombre de constituents) en el procés de resolució (veure figura 4.4.1d). Als components absents identificats se'ls assigna el valor de zero o un valor extremadament petit, clarament inferior al soroll experimental de les dades.

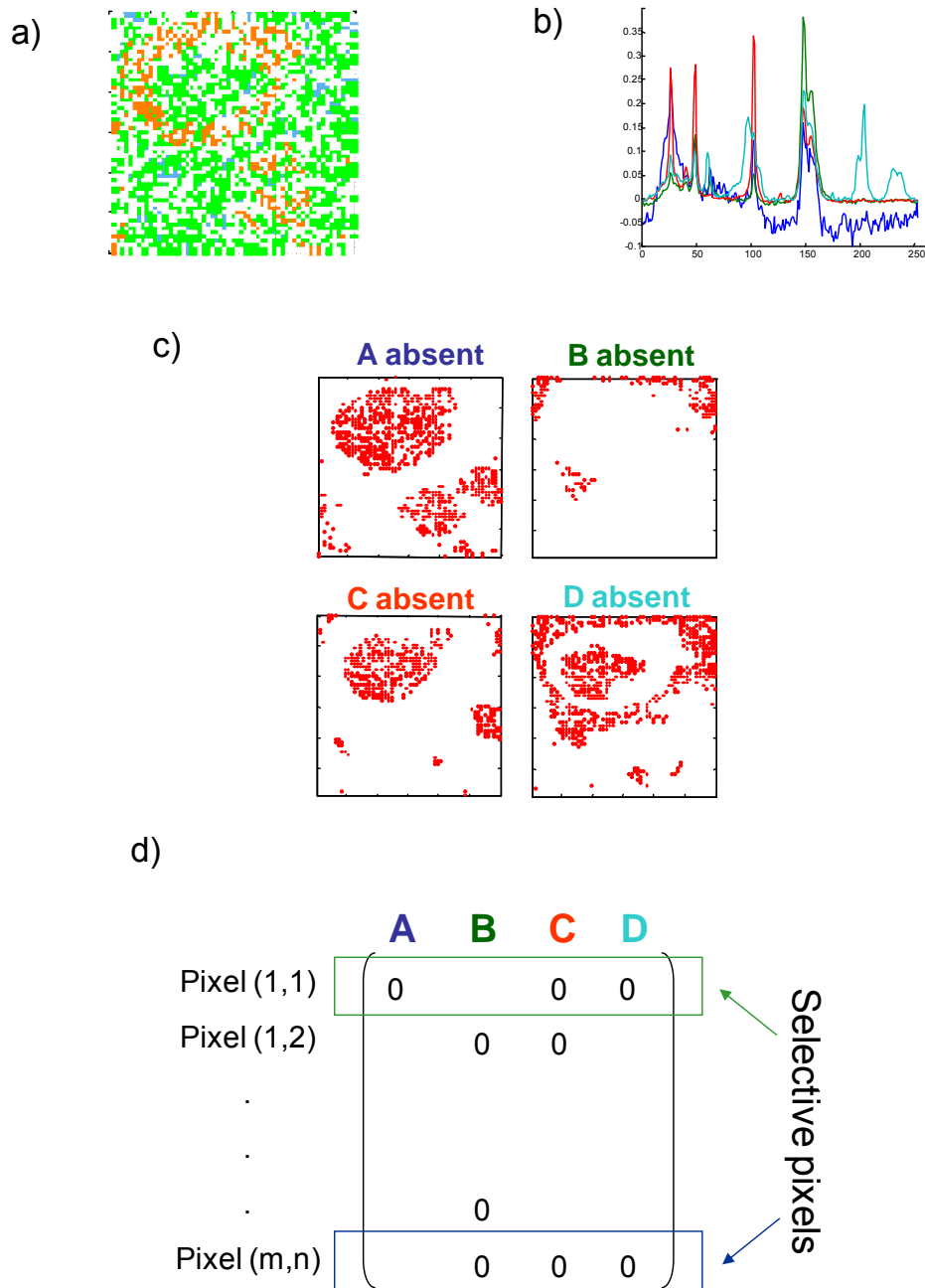


Figura 4.4.1 Esquema sobre el procediment d'introducció de la informació de rang local en el procés de resolució d'una imatge d'una emulsió. **a)** Mapa de rang local parcial **b)** Espectres de referència (estimació mitjançant SIMPLISMA) **c)** Representació dels píxels on cadascun dels components és absent en la imatge **d)** transferència de la informació en (c) a una matriu de restricció de rang local, csel.

La introducció de la informació de rang local millora la definició dels perfils de concentració i espectres purs dels components de la imatge. La restricció de rang local permet resoldre de manera efectiva els perfils de concentració i espectres purs, disminuint o suprimint per complet l'ambigüitat rotacional, quan les condicions dels teoremes de resolució hauran estat assolides^{42,50}.

Altres restriccions aplicables en altres tipus de conjunt de dades són la **unimodalitat**, que consisteix en que el perfil d'una espècie només presenti un màxim, i la **condició de sistema tancat** (*closure*), que correspon al balanç de matèria i que s'aplica quan la suma de les concentracions de totes les espècies que es poden detectar experimentalment en cada punt d'una reacció és constant. Aquestes restriccions no es defineixen amb més detall perquè no són aplicables a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals.

4.4.1 Resolució conjunta de diverses imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica

Un dels principals avantatges que presenta el mètode MCR-ALS és que permet l'anàlisi conjunta de diverses matrius de dades. Moltes vegades la matriu de dades d'un únic experiment no conté tota la informació necessària per a poder interpretar el sistema químic d'interès. En aquests casos, es poden construir estructures de dades multiconjunt (*multiset*) o matrius de dades augmentades **D**, que inclouen diferents submatrius **D_i**, relacionades amb diferents experiments (o imatges)(vegeu figura 4.4.1.1).

Una matriu augmentada en la direcció de les columnes **D_{aug}** permet ajuntar diferents experiments realitzats en diferents condicions experimentals (**D_i**) i seguits amb una tècnica comuna. D'aquesta forma, **D_{aug}** pot arribar a descriure el sistema de forma completa seguint el model bilineal descrit a continuació^{40,51}:

$$\mathbf{D}_{aug} = \begin{bmatrix} \mathbf{D}_1 \\ \mathbf{D}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{D}_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_1 \\ \mathbf{C}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{C}_N \end{bmatrix} \mathbf{S}^T + \begin{bmatrix} \mathbf{E}_1 \\ \mathbf{E}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{E}_N \end{bmatrix} = \mathbf{C}_{aug} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{aug} \quad \text{Equació 4.14}$$

A partir de la seva descomposició bilineal, s'obté \mathbf{C}_{aug} , que és la matriu augmentada per columnes dels perfils de concentració resolts per a cada component en les diferents mostres o experiments. Els mapes de distribució es recuperen replegant el perfil de concentració corresponent a cadascuna de les mostres analitzades conjuntament segons l'estructura bidimensional de la imatge original (vegeu figura 4.4.1). També s'obté \mathbf{S}^T , que és la matriu d'espectres purs dels compostos resolts comuna a tots els experiments analitzats.

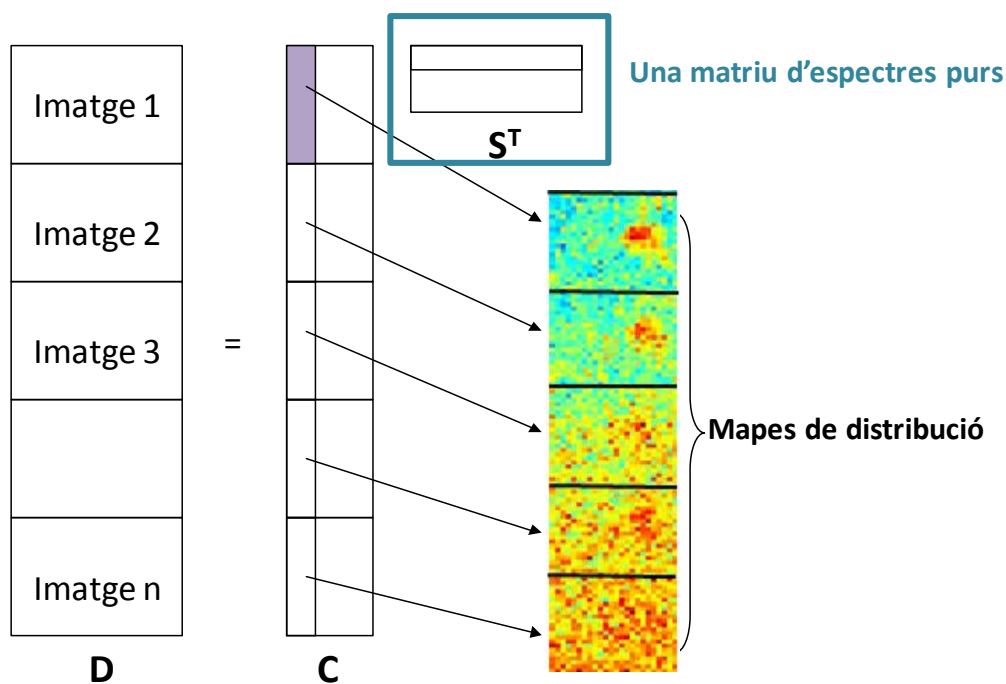


Figura 4.4.1.1 Representació del model bilineal de MCR-ALS per a una estructura multiconjunt.

Per tant, les imatges d'una matriu augmentada en la direcció de les columnes només cal que presentin la mateixa dimensió espectral; és a dir, han de ser obtingudes amb la mateixa tècnica i els espectres s'han d'adquirir en el mateix interval espectral. Això vol dir que les imatges analitzades poden tenir grandàries i configuracions espacials diferents. Aquesta forma d'augmentar la matriu de dades experimentals fa possible analitzar diferents imatges de la mateixa mostra durant un procés en funció de la temperatura, el pH, el temps,... o permet analitzar imatges de diferents mostres que tenen en comú, diferents compostos, com per exemple, l'anàlisi de comprimits d'una línia de producció, o l'anàlisi de teixits biològics de diferents pacients.

El procediment de resolució per MCR-ALS d'una matriu augmentada és similar a l'emprat per a l'anàlisi d'una sola matriu de dades. En la resolució de matrius augmentades es poden aplicar les mateixes restriccions descrites en l'apartat anterior. Les restriccions es poden aplicar de forma diferent a les diverses submatrius \mathbf{C}_i i \mathbf{S}^T . Existeix una restricció addicional d'especial interès en l'anàlisi de matrius augmentades en la direcció de les columnes. Aquesta nova restricció, coneguda amb el nom de **correspondència d'espècies**, s'utilitza per a l'assignació de les espècies presents a cada experiment (imatge). Mitjançant una matriu petita, que anomenarem **isp**, s'incorpora al procés de resolució la informació relativa a la presència o absència d'espècies en una imatge determinada. La matriu **isp** es construeix amb un sistema de codificació binari. Així doncs, quan una espècie és present al sistema se li assigna un 1, mentre que quan és absent se li assigna un 0. A les espècies absents se'ls assigna un perfil de concentració nul.

Per exemple, la matriu **isp** procedent d'una matriu augmentada formada per dues imatges i un total de quatre espècies (a, b, c, d) és la següent:

$$\mathbf{isp} = \begin{array}{ccccc} & \mathbf{a} & \mathbf{b} & \mathbf{c} & \mathbf{d} \\ \left[\begin{array}{cccc} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 \end{array} \right] & \text{Imatge 1} & & & \\ & & & & \text{Imatge 2} \end{array}$$

això vol dir que la primera imatge només té dues espècies (a i b), mentre que la segona imatge té totes les espècies (a, b, c, d). Quan és possible utilitzar estructures multiconjunt on les imatges que les formen tenen diferent informació de presència/absència de constituents, la qualitat de la resolució millora enormement, ja que aquesta restricció té el mateix efecte de disminució d'ambigüitat rotacional que la restricció de selectivitat o rang local.

Els resultats de la resolució poden ser utilitzats per a obtenir diferents tipus d'informació, tals com la identificació dels constituents de la imatge mitjançant l'ús dels espectres resolts o l'anàlisi quantitativa dels constituents presents en les imatges. El desenvolupament d'aquestes eines d'anàlisi per a la interpretació química d'aquest tipus de mesura s'exposaran al llarg de la secció de resultats i discussió per a cadascun dels casos estudiats en aquesta tesi.

4.4.2 Resolució conjunta de diverses imatges adquirides amb diferents tècniques espectroscòpiques

El mètode MCR-ALS també permet l'anàlisi conjunta de matrius augmentades en la direcció de les files (anàlisi de la mateixa mostra o experiments amb diferents tècniques espectroscòpiques). La matriu augmentada per files també es descompon en un model bilineal segons la següent expressió:

$$\mathbf{D}_{aug} = [\mathbf{D}_1, \mathbf{D}_2] = \mathbf{C}[\mathbf{S}_1^T, \mathbf{S}_2^T] + [\mathbf{E}_1, \mathbf{E}_2] = \mathbf{C}\mathbf{S}_{aug}^T + \mathbf{E}_{aug} \quad \text{Equació 4.15}$$

En aquest cas, s'obté una única matriu de perfils de concentració resolts (\mathbf{C}) i una matriu augmentada per files \mathbf{S}_{aug}^T que conté els espectres purs de les diferents tècniques utilitzades, (\mathbf{S}_i^T). \mathbf{E}_{aug} és la matriu de soroll o residuals, és a dir, la part de la matriu \mathbf{D}_{aug} que no queda explicada pel model bilineal. En aquest cas, es proporciona una definició dels perfils de concentració del sistema més robusta (\mathbf{C}) i unes respostes (\mathbf{S}_{aug}^T) que permeten discriminar millor entre compostos per la diversitat de la informació espectral utilitzada (vegeu figura 4.4.2.1).

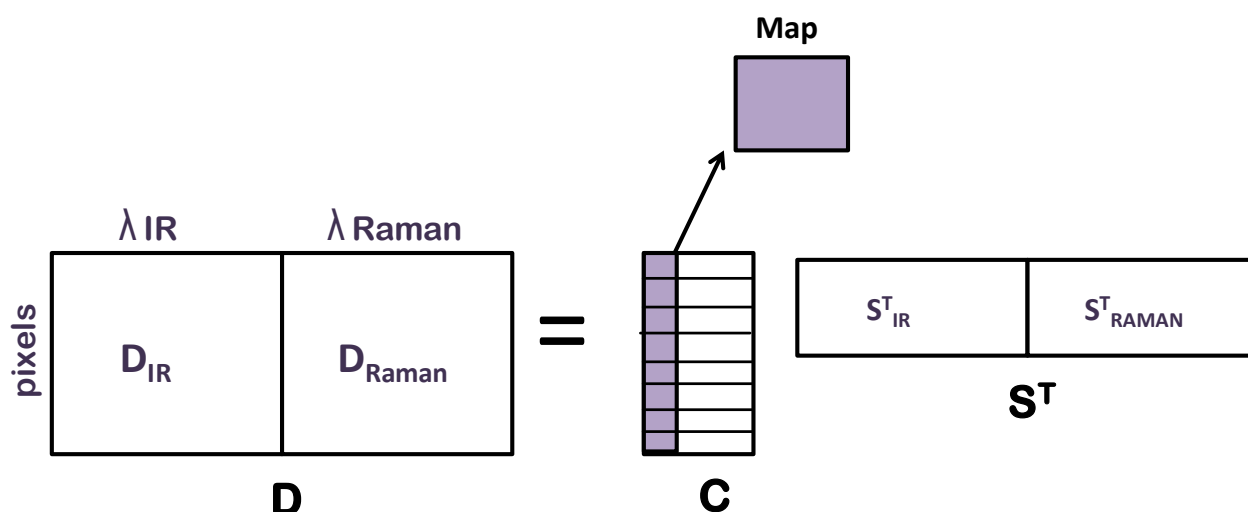


Figura 4.4.2.1. Representació del model bilineal de MCR-ALS per a l'anàlisi de dues imatges obtingudes amb diferents tècniques espectroscòpiques.

Quan es volen analitzar conjuntament imatges obtingudes sobre la mateixa mostra amb diferents tècniques espectroscòpiques, les imatges acoblades en la direcció de les files han de tenir la mateixa grandària total i de píxel i estar recollides sobre la mateixa àrea de la mostra. És a dir, els píxels anàlegs de les diferents imatges han de ser congruents especialment. Aquest requisit és més costós d'assolir, ja que la majoria de tècniques presenten diferents paràmetres instrumentals que dificulten l'obtenció d'imatges amb la mateixa resolució i localització espacial.

Cal, doncs, proposar mètodes de preprocessat que permetin realitzar transformacions espacials, de desplaçament i rotació per a assolir la congruència entre imatges i usar algoritmes que compensin diferències de resolució espacial. Els procediments de treball proposats inclouen l'optimització d'algoritmes de preprocessat i l'ús d'una variant del mètode MCR-ALS per a una bona definició i qualitat dels resultats finals de l'anàlisi simultània de matrius augmentades en la direcció de les files. El desenvolupament d'aquests procediments i la seva aplicació pràctica es troben explicats detalladament en la secció 5.4.

Un cop realitzat l'acoblament entre imatges, el procediment de resolució per MCR-ALS d'una matriu augmentada és similar a l'emprat per a l'anàlisi d'una sola matriu de dades. En la resolució

de matrius augmentades en la direcció de les files es poden aplicar les mateixes restriccions descrites en l'apartat 4.4. Les restriccions es poden aplicar de forma diferent a les diverses submatrius \mathbf{C}_i i \mathbf{S}_i^T . L'aplicació de restriccions i l'anàlisi multiconjunt disminueixen l'ambigüitat del sistema i milloren la qualitat dels resultats i, per tant, la seva interpretació química i/o biològica.

Per a totes les anàlisis de resolució d'aquesta tesi, l'algoritme MCR-ALS s'ha aplicat utilitzant la toolbox de MCR-ALS disponible al web www.mcrals.info⁵².

4.5 SEGMENTACIÓ D'IMATGES

Les tècniques de segmentació d'imatges es basen en l'ús d'eines quimiomètriques que permeten separar regions de la imatge en funció de la similitud dels seus píxels⁵³. Normalment, són considerats píxels similars aquells que tenen espectres semblants i, per tant, composició, propietats químiques o biològiques similars. La identificació de grups de píxels similars és un dels principals objectius en l'anàlisi d'imatges hiperespectrals.

La segmentació d'imatges és important per a interpretar la informació que no es troba continguda en els píxels individuals, sinó en regions de la imatge i en la relació que hi ha entre elles. Aquesta eina és utilitzada en el camp mèdic amb l'objectiu d'identificar i caracteritzar teixits i òrgans, per a la detecció de cèl·lules anòmales i per al diagnòstic clínic⁵⁴. També és una eina emprada en l'anàlisi de fotografies aèries o per satèl·lit per a la classificació de diferents tipus de vegetació, per a l'estudi de la seva degradació o en la classificació i control de cultius en sòls agrícoles⁵⁵.

Les tècniques de segmentació es classifiquen en mètodes supervisats i mètodes no supervisats. Els mètodes no supervisats no disposen d'informació prèvia dels possibles grups o diferents regions presents en la imatge; en canvi, els mètodes supervisats disposen d'informació prèvia sobre les classes d'interès.

Els mètodes supervisats permeten assignar els píxels d'una imatge a classes ben definides. Aquests mètodes de segmentació són molt útils, per exemple, en la classificació de regions sanes i malaltes en mostres biomèdiques ^{49,56,57}. Els mètodes de segmentació no supervisats no disposen d'informació de referència sobre les classes i es basen en agrupar conjunts de píxels segons criteris de similitud. Hi ha molts criteris de similitud i els més utilitzats es basen en l'ús de les distàncies entre els espectres dels píxels ^{57,58}. La distància d'ús més habitual és l'euclidiana. La distància euclidiana entre els espectres ⁵⁷ de dos píxels i i j es defineix com:

$$d(i, j) = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{ik} - x_{jk})^2} \quad \text{Equació 4.16}$$

on n és el nombre de longituds d'ona dels espectres i x_{ik} , x_{jk} són els valors d'absorbància dels espectres dels píxels i i j a una determinada longitud d'ona, k . Així, píxels amb espectres molt semblants tindran una distància euclidiana petita entre ells, encara que estiguin molt llunyans en l'estructura bidimensional de la imatge.

L'anàlisi de segmentació d'una imatge proporciona dos resultats interessants: l'esquema o mapa de segmentació, on es visualitzen les regions o classes trobades en la imatge, i els perfils dels centroides, que són els valors mitjans (de l'espectre o de la informació inicial utilitzada per a la segmentació) que corresponen a cada classe. El mapa de segmentació permet veure la localització de les diferents classes de la imatge i els centroides aporten informació sobre les seves característiques químiques (vegeu figura 4.5.1).

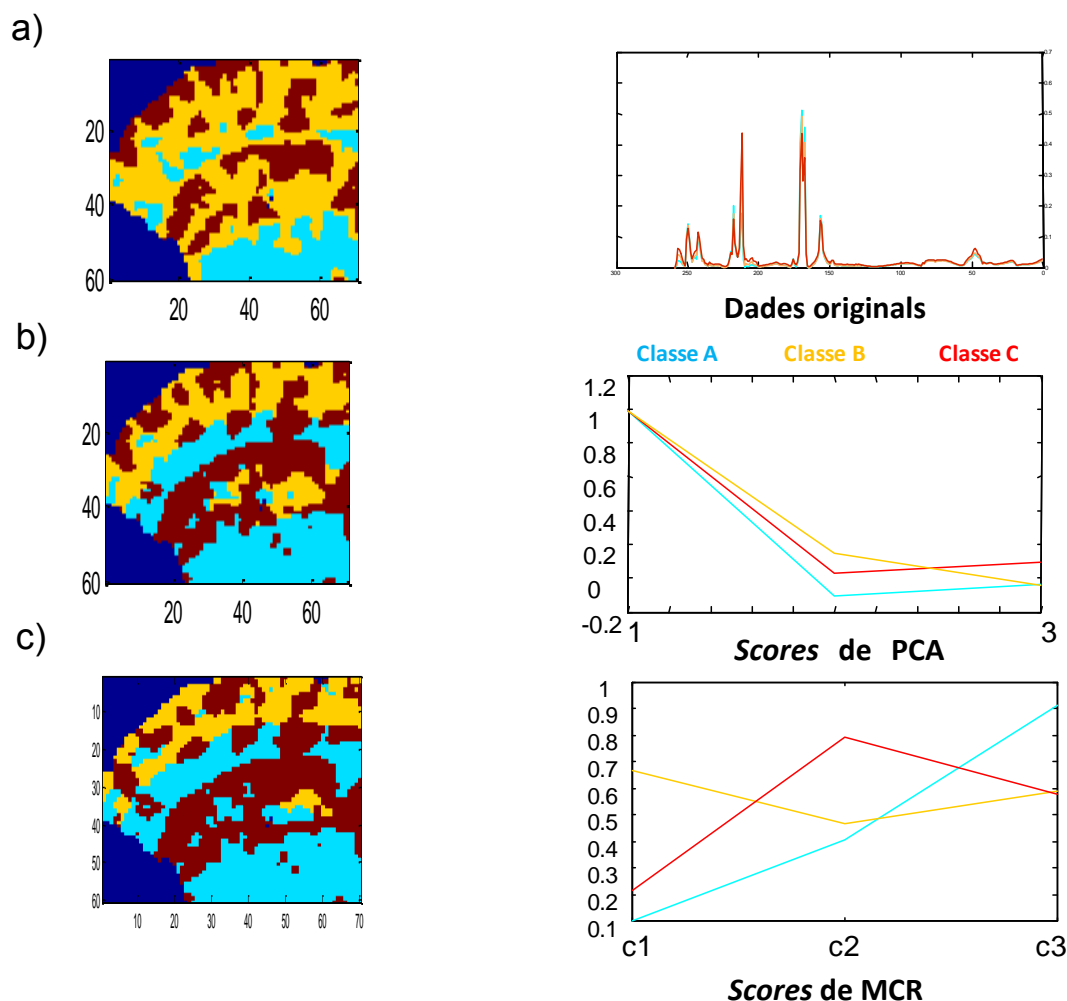


Figura 4.5.1 Resultats de l'anàlisi de segmentació mitjançant l'algoritme K-means. A la dreta els mapes de segmentació i a l'esquerra els perfils dels centroides obtinguts **a)** a partir de les dades originals **b)** a partir dels *scores* de PCA i **c)** a partir dels *scores* de MCR.

Existeix un gran nombre de mètodes de segmentació capaços de proporcionar els mapes de segmentació i els perfils dels centroides. Els diferents algorismes es poden classificar en tres tipus de mètodes: mètodes de partició⁵⁹, mètodes jeràrquics^{60,61} i mètodes d'agrupació basats en densitats⁶².

Mètodes de partició: A partir d'un conjunt inicial de particions, on el paràmetre k és el nombre de classes, s'empra una tècnica de reubicació iterativa que intenta millorar les particions en moure els espectres d'una classe a una altra.

Mètodes jeràrquics: Realitzen particions successives a diferents nivells d'agregació o d'agrupament sempre relacionades amb el nivell anterior. Fonamentalment, els mètodes jeràrquics es subdivideixen en mètodes aglomeratius (ascendents), que van fusionant successivament classes existents a cada nivell jeràrquic, i mètodes divisius (descendents), que van desglossant en classes cada cop més petites el conjunt total de les dades.

Mètodes basat en densitats: Aquests mètodes consideren les classes com regions denses d'objectes en l'espai de les dades, les quals són separades mitjançant regions de baixa densitat (representació del soroll).

4.5.1 Mètode de partició: algoritme de segmentació K-means

En aquesta tesi s'ha treballat amb el mètode de partició no supervisat K-means. K-means és un dels algoritmes més utilitzats en les anàlisis de segmentació d'imatges per la simplicitat i rapidesa amb què treballa, rellevant per a la gestió de conjunts grans de dades, com són les imatges hiperespectrals⁶³.

L'algoritme K-means divideix la imatge en un nombre de classes k , on cada píxel és assignat al grup o clúster que tingui el centroides més proper. Aquest procediment es duu a terme de forma iterativa fins que s'obté un esquema de segmentació estable. En resum, els passos a seguir són:

1. Selecció del nombre de clústers, k
2. Generació de k centroides.
3. Assignació de cada píxel a un clúster en funció de la distància euclidiana al centroides.
4. Recàlcul dels centroides després de l'etapa d'assignació dels píxels.
5. Repetició dels passos 3 i 4 fins que l'esquema de segmentació resulti estable.

Com a mètode de segmentació de partició, el primer pas que cal fer és la selecció del nombre de clústers. Es pot tenir un coneixement previ o bé seleccionar-lo mitjançant criteris d'índexs de validesa de clústers, com l'índex Davies-Bouldin⁶⁴, l'índex Dunn⁶⁵, l'índex C⁶⁶ o l'indicador

silueta. En aquesta tesi s'han emprat l'índex de Davies-Bouldin i l'índex de silueta com a criteris estadístics, ja que són els menys sensibles a la presència de píxels anòmals. L'índex de Davies-Bouldin es defineix com:

$$DB = \frac{1}{n} \sum_{i=1, 1 \neq j}^n \max \left(\frac{\sigma_i + \sigma_j}{d(c_i, c_j)} \right) \quad \text{Equació 4.17}$$

on n és el nombre de classes, σ_i és la distància mitjana entre tots els píxels del clúster i i el seu centroide, σ_j és la distància mitjana entre tots els píxels del clúster j i el seu centroide i $d(c_i, c_j)$ és la distància entre els centroides (c) del clúster i i el clúster j . El nombre de clústers que minimitza l'índex DB és el seleccionat com a nombre òptim de clústers. L'índex silueta es defineix com:

$$s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max\{a(i), b(i)\}} \quad \text{Equació 4.18}$$

on $a(i)$ és la distància mitjana del píxel i amb els altres píxels del clúster i $b(i)$ és la distància mitjana del píxel i amb els píxels del clúster que li és més proper. L'índex de silueta es defineix per a cada píxel. La mitjana per a tots els objectes d'un clúster és una indicació de la compacitat del clúster. El valor de la mitjana per a tots els clústers representa la qualitat de tot l'esquema de segmentació. A valors més elevats, millors esquemes de segmentació.

S'assumeix que el nombre de clústers ha de ser igual o lleugerament superior al nombre de constituents en la imatge, ja que les classes poden ser regions de constituents purs o de mescles de constituents. En general, a l'hora d'elegir el nombre de clústers es té en compte el nombre de clústers suggerit pels índexs de validesa i la interpretabilitat de l'esquema de segmentació.

En l'algoritme K-means, els centroides inicials es poden triar de forma aleatòria i llavors s'executa l'algoritme unes quantes vegades per tal d'obtenir un esquema de segmentació estable. Alternativament, es pot fer una millor tria dels centroides (de forma que siguin píxels força diferents entre ells), s'executa l'algoritme diverses vegades i s'adopta com a resultat final els

resultats finals els associats amb el valor mínim dels sumatoris de les distàncies de cadascun dels píxels pertanyents a una classe respecte el seu al seu respectiu centroid. S'ha optat per aquesta darrera opció ⁶⁷.

Com ja s'ha dit anteriorment, la informació de partida en una anàlisi de segmentació d'imatges solen ser els espectres dels píxels, la forma dels quals està relacionada amb la seva composició. Hi ha, però, representacions de la composició dels píxels que són de dimensions més petites i que mantenen tota la informació rellevant, com són els *scores* de PCA o la matriu de perfils de concentracions que s'obté després d'aplicar un mètode de resolució.

En la secció de resultats i discussió es comentaran els avantatges d'aplicar l'algoritme K-means sobre els *scores* de MCR d'una imatge. Per altra banda, també es descriu l'ús per primer cop de l'algoritme K-means sobre una estructura multiconjunt d'imatges .

L'algoritme K-means s'ha aplicat tal i com està codificat en la Toolbox PLS+ MIA d'Eigenvector Research. www.eigenvector.com.

4.6 TÈCNIQUES DE SUPERRESOLUCIÓ D'IMATGES

L'adquisició d'imatges d'elevada resolució espacial resulta clau en molts camps d'aplicació, com són l'àmbit biomèdic i l'àrea de sensors remots per a la identificació d'objectes d'una mida propera al límit òptic ⁶⁸. El límit òptic és degut a la difracció de la llum, que crea una imatge anular amb un patró de difracció característic denominat *disc d'Airy*. El límit òptic degut a la difracció, x , és calcula a partir del criteri de Rayleigh:

$$x = \frac{1,22\lambda}{n \sin\theta}$$

Equació 4.19

on λ és la longitud d'ona de la llum, n l'índex de refracció i $\sin \theta$ és l'obertura numèrica. Aquest factor s'utilitza per a la determinació de la resolució espacial d'una imatge, és a dir, la capacitat de distingir dos objectes petits molt propers entre ells.

La resolució espacial d'un microscopi es troba condicionada pel límit de difracció, és a dir, segons el criteri de Rayleigh (equació 4.19), per l'obertura numèrica del objectiu, del medi de refracció en què es du a terme la mesura i de la longitud d'ona d'excitació. Per exemple, la microscòpia Raman presenta una resolució espacial més elevada que la microscòpia d'infraroig, ja que emprava llum visible com a font d'excitació.

Diferents avenços instrumentals, com el disseny d'objectius amb baix índex de refracció (cas de l'accessori ATR per a microscòpia d'infraroig) i l'ús de radiació de gran lluminositat i coherència de feix com és la radiació de sincrotró, han col·laborat en la millora de la resolució espacial en les diferents tècniques de microespectroscòpia.

Tot i que s'han aconseguit grans millores a partir de l'evolució instrumental, el límit de difracció és un paràmetre acotat instrumentalment. Per a superar aquesta limitació, al voltant del 1980 es comencen a desenvolupar mètodes matemàtics de superresolució dins l'àrea de preprocessat digital de la imatge. L'objectiu principal de les tècniques de superresolució és l'augment de la resolució espacial superant les limitacions físiques especificades pel sistema òptic. L'ús d'algoritmes de superresolució no implica cost i no resulta necessària la renovació dels sistemes instrumentals d'adquisició d'imatges. Sovint els algoritmes de superresolució són l'única opció factible per a l'augment de la resolució espacial de la imatge.

Els algoritmes de superresolució es basen en la combinació de la informació d'un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial (LR) del mateix objecte/mostra amb l'objectiu de compondre una imatge d'elevada resolució espacial (HR) ^{69,70}. L'algoritme de superresolució emprat en aquesta tesi ha estat adaptat per Ludovic Duponchel et al. ⁷¹ a dades de microespectroscòpia molecular. L'algoritme consta dels passos següents:

1. Adquisició d'un nombre determinat d'imatges de baixa resolució espacial amb un desplaçament en les direccions x i/o y , igual o menor a la mida de píxel de la imatge d'elevada resolució espacial desitjada.
2. Reconstrucció d'una imatge d'elevada resolució espacial a partir de la combinació de les imatges de baixa resolució, utilitzant informació relacionada amb el soroll experimental, el desplaçament entre imatges i la funció d'alta resolució de dispersió, que té a veure amb l'enfocament del feix de llum en cada píxel.

L'algoritme de superresolució adaptat per Duponchel et al considera que cada imatge de baixa resolució espacial és el resultat de transformacions de translació, desenfocament i *binning* aplicades a una imatge d'elevada resolució espacial. També és té en consideració el soroll gaussià de les imatges de baixa resolució espacial. El pas d'una imatge d'alta resolució \underline{X} a una de baixa resolució \underline{Y} es pot descriure segons el model analític següent:

$$\underline{Y}_k = \underline{D}_k \underline{H}_k \underline{F}_k \underline{X} + \underline{V}_k \quad \text{Equació 4.20}$$

La matriu $\{\underline{Y}_k\}_k^N$ de dimensió $M_1 \times M_2$ correspon a una de les imatges de baixa resolució espacial i la matriu \underline{X} de dimensió $[L_1 \times L_2]$ correspon a la matriu de la imatge d'alta resolució espacial. M_1 i M_2 són el nombre de píxels corresponents a les imatges de baixa resolució espacial i L_1 i L_2 són els píxels de la imatge d'alta resolució espacial. La matriu \underline{F}_k de dimensió $[L_1 L_2 \times L_1 L_2]$ correspon als moviments de translació entre les imatges de baixa resolució espacial i la imatge d'alta resolució espacial que es vol compondre. Gràcies al control de la plataforma motoritzada dels sistemes microespectroscòpics és té un coneixement dels moviments de translació entre les imatges. La matriu \underline{H}_k de dimensió $[L_1 L_2 \times L_1 L_2]$ correspon a la matriu de desenfocament definida per la funció de dispersió de punt (PSF) del sistema òptic. La funció PSF descriu la resposta d'un sistema d'imatge en un punt de la font o punt de l'objecte. La matriu \underline{D}_k de dimensió $[M_1 M_2 \times L_1 L_2]$ correspon al *binning* necessari per a obtenir la imatge de baixa resolució, és a dir, en la reducció del nombre de píxels observats en la imatge de baixa resolució. Finalment, el soroll gaussià de la

imatge de baixa resolució Y_k es troba definit en la matriu V_k . En la figura 4.6.1 es mostra la representació gràfica del model analític emprat en l'algoritme de Superresolució.

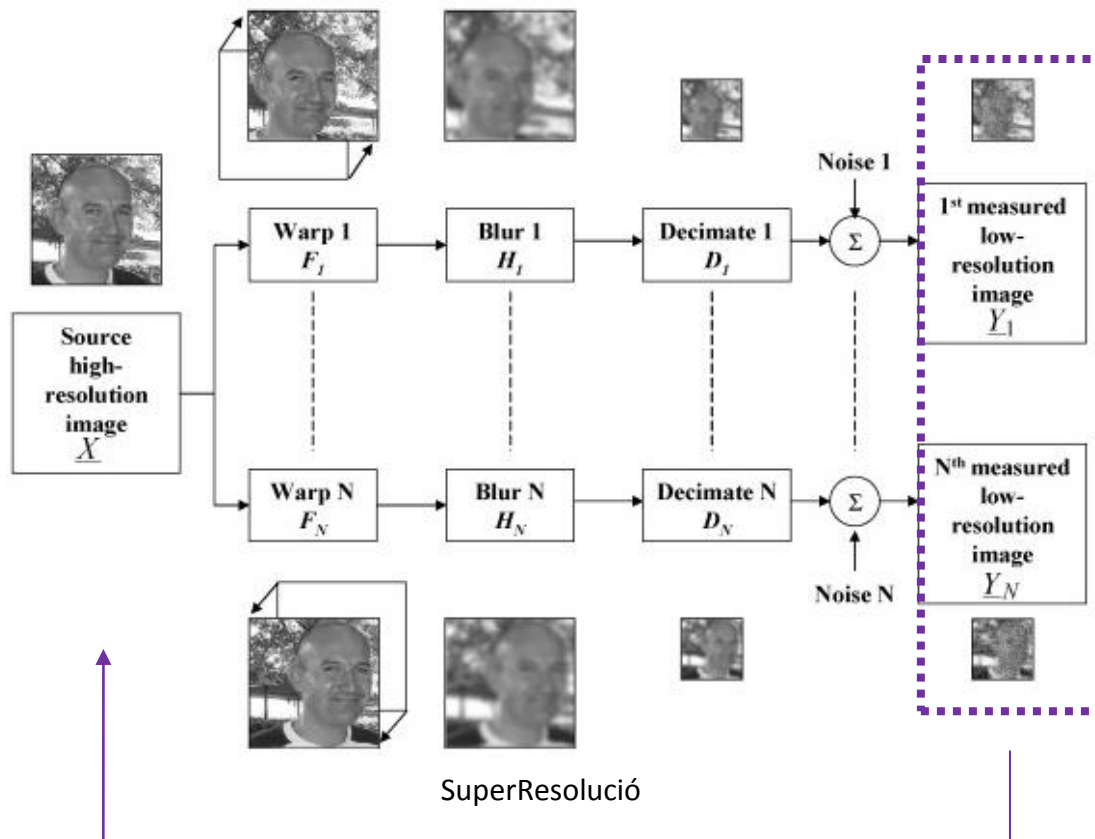


Figura 4.6.1 Representació del model analític emprat en l'algoritme de Super-Resolució. Cada una de les imatges de baixa resolució és una versió transformada, sotmesa a *binning*, desenfocada i sorollosa de la imatge d'alta resolució espacial original.

Així, s'ha vist que el problema de la superresolució és un problema invers, que es basa en la reconstrucció d'una imatge d'elevada resolució espacial a partir d'un conjunt d'imatges de baixa resolució adquirides sobre la mateixa superfície de mostra analitzada. Aquest tipus de problema es caracteritza perquè no posseeix una solució única, de manera que és necessari un coneixement previ de les matrius implicades en el model analític. També resulta clau en aquest procés la definició del nombre d'imatges de baixa resolució necessàries per aconseguir una solució correcta al problema. S'ha de aconseguir un nombre d'imatges (N) de baixa resolució

espacial que compleixi que $L_1 > M_1$ i a l'hora que $L_2 > M_2$ per assegurar un pas de píxel igual o menor a la mida de píxel imatge d'alta resolució espacial. És necessari que el nombre d'imatges N de baixa resolució compleixi el següent criteri:

$$L_1 L_2 < N M_1 M_2$$

Equació 4.21

El model analític de Super-Resolució per a un conjunt N d'imatges és defineix com:

$$\begin{pmatrix} \underline{Y}_1 \\ \vdots \\ \underline{Y}_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \underline{D}_1 \underline{H}_1 \underline{F}_1 \\ \vdots \\ \underline{D}_N \underline{H}_N \underline{F}_N \end{pmatrix} \underline{X} + \begin{pmatrix} \underline{V}_1 \\ \vdots \\ \underline{V}_N \end{pmatrix}$$

Equació 4.22

La imatge d'elevada resolució espacial es reconstrueix mitjançant l'estimació per màxima versemblança (*Maximum-Likelihood estimation MLE*)^{72,73}. \underline{X} es calcula mitjançant mínims quadrats ponderats a través de la següent equació 4.22:

$$\hat{\underline{X}} = \text{Argmin}_{\underline{X}} \left\{ \sum_{k=1}^N [\underline{Y}_k - \underline{D}_k \underline{H}_k \underline{F}_k \underline{X}]^T \underline{V}_k^{-1} [\underline{Y}_k - \underline{D}_k \underline{H}_k \underline{F}_k \underline{X}] \right\}$$

Equació 4.23

Resoldre l'equació 4.22 resulta molt tediós degut a les grans dimensions de les matrius implicades. Aquesta estratègia, que havia estat pensada per a imatges en escala de gris, resulta de difícil aplicació directa en imatges hiperespectrals, ja que caldria resoldre l'equació 4.23 per a cadascun dels canals espectrals mesurats, la qual cosa suposaria un temps de computació extremadament elevat. En aquesta tesi s'ha desenvolupat una estratègia per a l'augment de resolució espacial d'una imatge hiperespectral basat en l'aplicació d'aquest algoritme únicament als mapes de distribució resolts en l'anàlisi multiconjunt de les imatges de baixa resolució espacial. Més detall sobre aquesta metodologia es pot trobar a la secció de resultats.

4.7 BIBLIOGRAFIA

- (1) De Juan, A., Piqueras, S., Maeder, M., Hancewicz, T., Duponchel, L., and Tauler, R. (2014) Chemometric Tools for Image Analysis, in *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging* (Salzer, R., and Siesler, H. W., Eds.) 2nd ed., pp 57–110. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- (2) Chen, Y., Chao, K., and Kim, M. S. (2002) Machine vision technology for agricultural applications. *Comput. Electron. Agric.* 36, 173–191.
- (3) Gat, N. (2000) Imaging spectroscopy using tunable filters: a review, in *AeroSense 2000* (Szu, H. H., Vetterli, M., Campbell, W. J., and Buss, J. R., Eds.), pp 50–64. International Society for Optics and Photonics.
- (4) Esbensen, K., and Geladi, P. (1989) Strategy of multivariate image analysis (MIA). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 7, 67–86.
- (5) F.Grahn, H., and Geladi, P. (2007) Techniques and Applications of hyperspectral Image analysis John Wiley. Ltd.
- (6) Geladi, P., and Grahn, H. (1996) Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis. John Wiley. Chichester, UK.
- (7) Wold, S., Esbensen, K. I. M., and Geladi, P. (1987) Principal Component Analysis 2, 37–52.
- (8) Lied, T. T., Geladi, P., and Esbensen, K. H. (2000) Multivariate image regression (MIR): implementation of image PLSR-first forays. *J. Chemom.* 14, 585–598.
- (9) Esbensen, K. H., Geladi, P. L., and Grahn, H. F. (1992) Strategies for multivariate image regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 14, 357–374.
- (10) Geladi, P., and Esbensen, K. (1991) Regression on multivariate images: Principal component regression for modeling, prediction and visual diagnostic tools. *J. Chemom.* 5, 97–111.
- (11) ElMasry, G., and Sun, D.-W. (2010) Principles of hyperspectral imaging technology, in *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* (Sun, D.-W., Ed.) 1st ed. Academic Press.
- (12) Yao, H., and Lewis, D. (2010) Spectral Preprocessing and Calibration techniques, in *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* (Sun, D.-W., Ed.) 1st ed., pp 45–78. Academic Press.
- (13) Mie, G. (1908) Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 330, 377–445.
- (14) Mohlenhoff, B., Romeo, M., Diem, M., and Wood, B. R. (2005) Mie-type scattering and non-Beer-Lambert absorption behavior of human cells in infrared microspectroscopy. *Biophys. J.* 88, 3635–40.

- (15) Eilers, P. H. C. (2004) Parametric time warping. *Anal. Chem.* 76, 404–11.
- (16) E.T. W. (1923) A state space formulation of Whittaker graduation, with extensions. *Edinburgh Math. Soc* 41, 63.
- (17) Eilers, P. H. C. (2003) A Perfect Smoother. *Anal. Chem.* 75, 3631–3636.
- (18) Martens, H., and Stark, E. (1991) Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9, 625–635.
- (19) Kohler, A., Kirschner, C., Oust, A., and Martens, H. (2005) Extended Multiplicative Signal Correction as a Tool for Separation and Characterization of Physical and Chemical Information in Fourier Transform Infrared Microscopy Images of Cryo-sections of Beef Loin. *Appl. Spectrosc.* 59, 707–716.
- (20) Burger, J., and Geladi, P. (2007) Spectral pre-treatments of hyperspectral near infrared images: analysis of diffuse reflectance scattering. *J. Near Infrared Spectrosc.* 15, 29–38.
- (21) Ravn, C., Skibsted, E., and Bro, R. (2008) Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms-comparing common calibration approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 554–61.
- (22) Gendrin, C., Roggo, Y., and Collet, C. (2008) Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 533–53.
- (23) Savitzky, A., and Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.
- (24) Chen, J., Jönsson, P., Tamura, M., Gu, Z., Matsushita, B., and Eklundh, L. (2004) A simple method for reconstructing a high-quality NDVI time-series data set based on the Savitzky–Golay filter. *Remote Sens. Environ.* 91, 332–344.
- (25) Felten, J., Hall, H., Jaumot, J., Tauler, R., de Juan, A., and Gorzsás, A. (2015) Vibrational spectroscopic image analysis of biological material using multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). *Nat. Protoc.* 10, 217–40.
- (26) Massart, D. L., Vandeginste, B. G., Buydens, L. M. C., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J., and Jong, S. De. (1997) Data Handling in Science and Technology, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* Elsevier. Elsevier Science Inc.
- (27) Burger, J., and Geladi, P. (2006) Hyperspectral NIR image regression part II: dataset preprocessing diagnostics. *J. Chemom.* 20, 106–119.
- (28) Tatzer, P., Wolf, M., and Panner, T. (2005) Industrial application for inline material sorting using hyperspectral imaging in the NIR range. *Real-Time Imaging* 11, 99–107.

- (29) De Juan, A., Jaumot, J., and Tauler, R. (2014) Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Anal. Methods* 6, 4964–4976.
- (30) Bocklitz, T. W., Crecelius, A. C., Tarcea, N., Schmitt, M., Schubert, U. S., and Popp, J. (2013) Deeper Understanding of Biological Tissue: Quantitative Correlation of MALDI-TOF and Raman Imaging. *Anal. Chem.* 85, 10829–10834.
- (31) Schaaff, T. G., McMahon, J. M., and Todd, P. J. (2002) Semiautomated Analytical Image Correlation 74, 4361–4369.
- (32) Malinowsky, E. R. (1991) Factor analysis in Chemistry 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- (33) Andrew, J. J., and Hancewicz, T. M. (1998) Rapid Analysis of Raman Image Data Using Two-Way Multivariate Curve Resolution. *Appl. Spectrosc.* 52, 797–807.
- (34) Windig, W., and Guilment, J. (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* 63, 1425–1432.
- (35) Windig, W., and Markel, S. (1993) Simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis of FTIR microscopy data. *J. Mol. Struct.* 292, 161–170.
- (36) Keller, H. R., and Massart, D. L. (1991) Evolving factor analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 12, 209–224.
- (37) Nascimento, J. M. P., and Dias, J. M. B. (2005) Vertex component analysis: a fast algorithm to unmix hyperspectral data. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 43, 898–910.
- (38) Bioucas-Dias, J. M., Plaza, A., Dobigeon, N., Parente, M., Du, Q., Gader, P., and Chanussot, J. (2012) Hyperspectral Unmixing Overview: Geometrical, Statistical, and Sparse Regression-Based Approaches. *IEEE J. Sel. Top. Appl. Earth Obs. Remote Sens.* 5, 354–379.
- (39) Juan, A. de, Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M., and Maeder, M. (2004) Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 70–79.
- (40) Tauler, R. (1995) Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30, 133–146.
- (41) Jaumot, J., Gargallo, R., de Juan, A., and Tauler, R. (2005) A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76, 101–110.
- (42) Tauler, R., K. Smilde, A., and R. Kowalski, B. (1995) Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J. Chemom.* 9, 31–58.
- (43) Abdollahi, H., and Tauler, R. (2011) Uniqueness and rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution methods. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 108, 100–111.

- (44) Tauler, R., Kowalski, B., and Fleming, S. (1993) Multivariate curve resolution applied to spectral data from multiple runs of an industrial process. *Anal. Chem.* 65, 2040–2047.
- (45) Tauler, R. (2001) Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution. *J. Chemom.* 15, 627–646.
- (46) Manne, R. (1995) On the resolution problem in hyphenated chromatography. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 27, 89–94.
- (47) Wang, J., Hopke, P. K., Hanczewicz, T. M., and Zhang, S. L. (2003) Application of modified alternating least squares regression to spectroscopic image analysis 476, 93–109.
- (48) Wentzell, P. D., Karakach, T. K., Roy, S., Martinez, M. J., Allen, C. P., and Werner-Washburne, M. (2006) Multivariate curve resolution of time course microarray data. *BMC Bioinformatics* 7, 343.
- (49) Keller, H. R., and Massart, D. L. (1991) Peak purity control in liquid chromatography with photodiode-array detection by a fixed size moving window evolving factor analysis. *Anal. Chim. Acta* 246, 379–390.
- (50) Juan, A. de, Rutan, S. C., and Tauler, R. (2009) ‘Two-way data analysis: Multivariate Curve Resolution: Iterative resolution methods’ in Comprehensive Chemometrics. (S. Brown, Tauler, R., and Walczak, B., Eds.) Elsevier.
- (51) De Juan, A., and Tauler, R. (2003) Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures. *Anal. Chim. Acta* 500, 195–210.
- (52) Jaumot, J., de Juan, A., and Tauler, R. (2015) MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 140, 1–12.
- (53) Tran, T. N., Wehrens, R., and Buydens, L. M. C. (2005) Clustering multispectral images: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 77, 3–17.
- (54) Wehrens, R., Simonetti, A. W., and Buydens, L. M. C. (2002) Mixture modelling of medical magnetic resonance data. *J. Chemom.* 16, 274–282.
- (55) Krooshof, P. W. T., Postma, G. J., Melssen, W. J., Buydens, L. M. C., and Tran, T. N. (2006) Effects of including spatial information in clustering multivariate image data. *TrAC Trends Anal. Chem.* 25, 1067–1080.
- (56) Massart, D. L., and Kaufman, L. (1983) The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- (57) Webb, A. R. (2003) Statistical Pattern Recognition. John Wiley & Sons, Ltd., Malvern, UK.
- (58) Jain, A. , Murty, M. , and Flynn, P. J. (1999) Data Clustering: A Review. *ACM Computing Surv.* 31, 264–323.

- (59) Noordam, J. C., van den Broek, W. H. A. M., and Buydens, L. M. C. (2000) Geometrically guided fuzzy C-means clustering for multivariate image segmentation, in *Proceedings 15th International Conference on Pattern Recognition. ICPR-2000*, pp 462–465. IEEE Comput. Soc.
- (60) Liang, J., and Kachalo, S. (2002) Computational analysis of microarray gene expression profiles: clustering, classification, and beyond. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 62, 199–216.
- (61) Smoliński, A., Walczak, B., and Einax, J. W. (2002) Hierarchical clustering extended with visual complements of environmental data set. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 64, 45–54.
- (62) Daszykowski, M., Walczak, B., and Massart, D. . (2001) Looking for natural patterns in data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 56, 83–92.
- (63) D.Tran, C. (2005) Principles, Instrumentation, and Applications of Infrared Multispectral Imaging, An Overview. *Anal. Lett.* 38, 735–752.
- (64) Davies, D. L., and Bouldin, D. W. (1979) A Cluster Separation Measure. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. PAMI-1*, 224–227.
- (65) Dunn, J. C. (1973) A Fuzzy Relative of the ISODATA Process and Its Use in Detecting Compact Well-Separated Clusters. *J. Cybern.* 3, 32–57.
- (66) Milligan, G. W., and Cooper, M. C. (1985) An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. *Psychometrika* 50, 159–179.
- (67) Gallagher, N. B., Shaver, J. M., Martin, E. B., Morris, J., Wise, B. M., and Windig, W. (2004) Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and Raman. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73, 105–117.
- (68) Merino, M. T., and Nunez, J. (2007) Super-Resolution of Remotely Sensed Images With Variable-Pixel Linear Reconstruction. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 45, 1446–1457.
- (69) Hadhoud, M. M., Abd El-Samie, F. E., and El-Khamy, S. E. (2004) New trends high resolution image processing, in *The Fourth Workshop on Photonics and Its Application, 2004.*, pp 1–23. IEEE.
- (70) Nguyen, N., Milanfar, P., and Golub, G. (2001) A computationally efficient superresolution image reconstruction algorithm. *IEEE Trans. Image Process.* 10, 573–83.
- (71) Duponchel, L., Milanfar, P., Ruckebusch, C., and Huvenne, J.-P. (2008) Super-resolution and Raman chemical imaging: from multiple low resolution images to a high resolution image. *Anal. Chim. Acta* 607, 168–75.
- (72) Elad, M., and Feuer, A. (1997) Restoration of a single superresolution image from several blurred, noisy, and undersampled measured images. *IEEE Trans. Image Process.* 6, 1646–58.
- (73) Elad, M., and Hel-Or, Y. (2001) A fast super-resolution reconstruction algorithm for pure translational motion and common space-invariant blur. *IEEE Trans. Image Process.* 10, 1187–93.

CAPÍTOL 5:

Resultats i discussió

5.1 DISSENY D'UN PROTOCOL METODOLÒGIC PER A LA RESOLUCIÓ INDIVIDUAL D'IMATGES RAMAN

Aquest apartat se centra en el desenvolupament d'un protocol metodològic per a la resolució individual d'imatges Raman mitjançant MCR-ALS. El procediment de treball proposat es basa en la identificació, quantificació i segmentació dels constituents presents en una imatge Raman a partir de l'ús dels resultats obtinguts mitjançant el mètode MCR-ALS. Els resultats d'aquest estudi es recullen en l'article 5.1-I.

5.1.-I Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Romà Tauler, Anna de Juan. ***Resolution and segmentation of Hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares***. Analytica Chimica Acta 705 (2011) 182-92.

L'article presenta una metodologia per a la resolució individual d'imatges Raman. Les mostres examinades són imatges Raman de dos talls de càlcul renal. Aquestes mostres presenten dos possibles escenaris, una imatge on tots els components són majoritaris (A) i una altra on hi ha presència de components majoritaris i minoritaris (B). En aquest treball es mostra el potencial de l'algoritme de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS) per a la descomposició de les dades originals en els perfils de concentració i espectres purs de les espècies presents en les imatges. La resolució individual de les imatges ha implicat la correcció de la línia de base per a la bona interpretació i aplicació de l'algoritme. També es mostra l'ús dels perfils de concentració i espectres purs per a la quantificació i identificació dels components i per a la segmentació de la imatge. A partir dels resultats obtinguts, s'ha proposat un protocol metodològic general per a la interpretació de la informació continguda en una imatge Raman, aplicable a tot tipus de mostres. El procediment de treball és flexible ja que es poden suprimir o incorporar passos depenent del problema químic d'interès i la naturalesa de la mostra.



Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares

S. Piqueras^{a,c}, L. Duponchel^b, R. Tauler^c, A. de Juan^{a,*}

^a Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b LASIR CNRS UMR 8516, Université Lille I, Sciences et Technologies, Bât. C5, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2011

Received in revised form 11 May 2011

Accepted 12 May 2011

Available online 20 May 2011

Keywords:

Image segmentation

MCR-ALS

K-means

Hyperspectral images

Asymmetric least-squares

ABSTRACT

MCR-ALS is a resolution method that has been applied in many different fields, such as process analysis, environmental data and, recently, hyperspectral image analysis. In this context, the algorithm provides the distribution maps and the pure spectra of the image constituents from the sole information in the raw image measurement. Based on the distribution maps and spectra obtained, additional information can be easily derived, such as identification of constituents when libraries are available or quantitation within the image, expressed as constituent signal contribution. This work summarizes first the protocol followed for the resolution on two examples of kidney calculi, taken as representations of images with major and minor compounds, respectively.

Image segmentation allows separating regions of images according to their pixel similarity and is also relevant in the biomedical field to differentiate healthy from non-healthy regions in tissues or to identify sample regions with distinct properties. Information on pixel similarity is enclosed not only in pixel spectra, but also in other smaller pixel representations, such as PCA scores. In this paper, we propose the use of MCR scores (concentration profiles) for segmentation purposes. K-means results obtained from different pixel representations of the data set are compared. The main advantages of the use of MCR scores are the interpretability of the class centroids and the compound-wise selection and preprocessing of the input information in the segmentation scheme.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hyperspectral images are an active area of research that has grown quickly since a decade ago. Hyperspectral images are measurements that contain spatial and spectral information and they provide chemical information and detailed knowledge of the distribution of the sample constituents in the surface (or volume) scanned. Hyperspectral imaging techniques based on Raman, infrared and fluorescence spectroscopy are useful methods in different areas, such as polymer research, materials science, biomedical diagnostic, pharmaceutical industry, analytical chemistry, process control and environmental analysis [1–5].

Biomedical images contain relevant information related to pathologies or to the configuration of natural tissues or of other formations produced by the body as a result of malfunctions, e.g. kidney calculi [6–8]. There are two aspects of particular interest in these images that deserve to be explored: the identity and distribution of the different image constituents and the presence of

sample regions with similar properties, which may be formed by pixels with pure or mixed compounds. From a data analysis point of view, these two aspects call for the use of image resolution and image segmentation approaches, respectively.

Hyperspectral image resolution has been introduced gradually during this decade. The aim of resolution methods is providing the distribution maps and pure spectra related to the image constituents of a sample from the information contained in the raw image. There are different approaches, some based on algorithms previously used to analyze chemical spectroscopic data sets and others coming from the remote sensing community [9–13]. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is an iterative resolution method oriented to recover the underlying spectroscopic bilinear model, i.e., concentration profiles (folded back into distribution maps) and pure spectra, by applying constraints related to chemical or mathematical properties of the profiles to be resolved. MCR-ALS has been proven to adapt particularly well to image resolution due to the ease of introduction of external spectral and spatial information about the image and to the ability to work with single and multiset image arrangements. MCR-ALS will be used to resolve the biomedical images and to show the further use of the distribution maps and the pure spectra to

* Corresponding author. Tel.: +34 934039778; fax: +34 934021233.

E-mail address: anna.dejuan@ub.edu (A. de Juan).

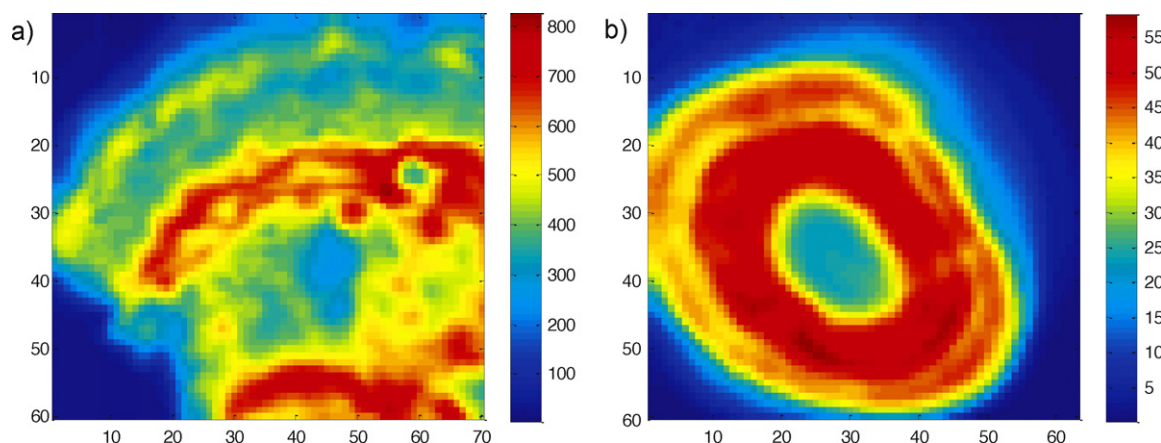


Fig. 1. Global intensity maps. (a) Renal calculus A, (b) renal calculus B.

obtain additional information, such as the identification of image constituents by using an external spectra library or the constituent quantitation estimated as the percentage of signal contribution over the global signal.

Image segmentation allows separating image regions according to their pixel similarity [14]. If there is no a priori information about the classes, the grouping of pixels has to be done in an unsupervised way. Clustering organizes image pixels into homogenous groups by using distance-based criteria or, equivalently, another similarity measure [15,16]. K-means is among the most popular 'hard' partitioning clustering algorithms and it is widely used for large image data sets because it is computationally less heavy than hierarchical approaches [17,18].

Information on similarity is enclosed not only in pixel spectra, but also in other smaller pixel representations, such as PCA scores. The main and most novel aspect of this paper is the proposal of the use of MCR-ALS results as input information for segmentation purposes. Indeed, concentration profiles and pure spectra can be named MCR scores and loadings, respectively, in analogy with the terminology linked to other chemometric tools, such as PCA. Segmentation results obtained from original spectra, PCA scores and MCR scores will be compared in order to point out similarities and differences and to stress advantages linked to the use of MCR scores. These advantages can be summarized as follows: first, MCR scores provide a small and complete representation of the image pixel space; second, MCR scores are chemically meaningful, i.e., they are the concentrations of the pixel constituents in the image, and, hence, easy to interpret and third, the information of each constituent is contained in a separate concentration profile. This allows selecting some or all constituents for segmentation, (e.g., avoiding the use of background contributions), applying pretreatments in a component-wise fashion and interpreting easily the centroid properties in each segmentation class.

All the potential of MCR-ALS for image resolution and segmentation will be shown on a biomedical example, working with two images of renal calculi. These Raman images are representative examples of an image with major constituents and an image with major and minor constituents. Apart from the concrete information linked to these two particular samples, the methodology described might be considered as a general protocol on how to proceed for resolution and segmentation in the two different kinds of scenarios presented.

2. Image samples and image acquisition

The samples imaged are two cuts of renal calculi provided by a French Hospital. Renal calculi were first cut [8]. A polishing equip-

ment was then used to obtain a flat surface ready to be scanned. No other sample treatments were performed. A Bruker RFS 100/S instrument was used as a near-IR FT-Raman spectrometer with a CW Nd:YAG laser at 1064 nm as the excitation source. A laser power of 100 mW was used. The spectra ($404\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) were recorded with a resolution of 4 cm^{-1} and a 5 s acquisition time. An XY-motorized and computer controlled stage was used to assure systematic movement over the sample in order to obtain the mapping. A step of 50 microns was selected between two consecutive spatial positions on the sample.

Fig. 1a and b are the global intensity maps of the two renal calculi images. Each point in the global intensity map is the sum of all Raman intensities of a particular pixel spectrum. These images have been acquired by point-scanning and the pixel Raman spectra were recorded in the interval $404\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. The image size of renal calculus A is $60 \times 70 \times 775$ and of renal calculus B is $60 \times 63 \times 775$, being the first two figures pixels in x and y direction ($3\text{ mm} \times 3.5\text{ mm}$ for A and $3\text{ mm} \times 3.15\text{ mm}$ for B of total sample surface) and the third accounting for the number of spectral channels. These renal calculi are examples of a sample containing major compounds (A) and containing major and minor compounds (B), respectively.

3. Data analysis

3.1. Data preprocessing

A common problem in Raman images is the intense background associated with the fluorescence contribution. Indeed, Raman spectra from images have intense and irregularly shaped backgrounds, which cannot be corrected by simple approaches based on the subtraction of offsets, linear or simple polynomial functions. Since the positive Raman spectral features and the background have very different frequencies, a particularly suitable method for background correction is Asymmetric Least Squares (AsLS), proposed originally by Eilers to subtract baselines in chromatography, where the situation between the difference among the chromatographic peaks and the baseline is analogous to that between Raman features and fluorescent background in Raman images [19]. Fig. 2 shows the original raw and corrected spectra for renal calculus A by Asymmetric Least Squares. The spectral range between 2000 and 2500 cm^{-1} was removed for further analysis because of the high noise in the raw measurement and the lack of relevant information in this spectral range.

Since renal calculus B had constituents in very small proportion, we preferred not to proceed to perform a background correction to avoid the partial removal of small signals. Instead, the background

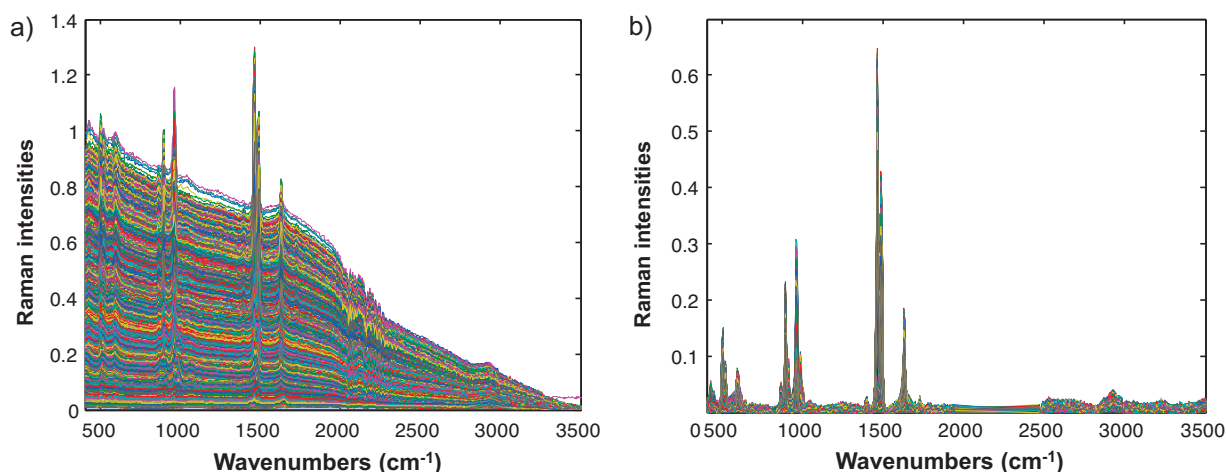


Fig. 2. (a) Raw spectra of renal calculus A. (b) Spectra of renal calculus A after baseline correction by Asymmetric Least Squares.

will be considered as an additional signal contribution to deal with during the image analysis.

3.2. Hyperspectral image resolution

The goal of hyperspectral image resolution and, consequently, of MCR-ALS is the decomposition of the original raw image into the distribution maps and pure spectra of the constituents [5,9,20–23]. Typically, resolution methods are based on the recovery of a bilinear model $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$, where \mathbf{D} is the raw measurement, \mathbf{C} is the matrix of concentration profiles and \mathbf{S}^T the matrix of related pure spectra. \mathbf{E} accounts for the experimental error contained in the raw measurement.

Although an image data set is structured as a data cube (3D), where two dimensions (x and y) are the pixel coordinates and the third is the spectral dimension (λ) (see Fig. 3), the spectroscopic measurement follows a bilinear model. To understand this fact, the data cube needs to be unfolded into a data matrix, where the rows are the pixel spectra and the columns are related to the wavelengths or spectral channels. Now, the matrix \mathbf{D} contains the raw

pixel spectra, which will be decomposed into the concentration profiles (\mathbf{C} matrix) and pure spectra (\mathbf{S}^T matrix) of the constituents present in the hyperspectral image. Every row of \mathbf{S}^T represents the pure spectrum of one of the image constituents. By taking a row of the \mathbf{C} matrix, information on the chemical composition of the related pixel can be obtained, whereas by taking a column, the pixel-to-pixel variation of the concentration of a particular image constituent can be seen. Then, by folding back each \mathbf{C} column to recover the original two-dimensional (2-D) or 3-D image configuration, the distribution map of each particular image constituent can be obtained (see Fig. 3). Since we work with real measurements, \mathbf{E} contains the experimental error left out of the bilinear model.

MCR-ALS is a resolution algorithm suitable to work with hyperspectral images that works following the next basic steps:

- (1) Determination of the number of constituents in the raw image (\mathbf{D}).
- (2) Generation of initial estimates (\mathbf{S}^T) based of the selection of the purest pixel spectra (SIMPLISMA) [24].
- (3) Given \mathbf{D} and \mathbf{S}^T , calculation of \mathbf{C} under constraints.

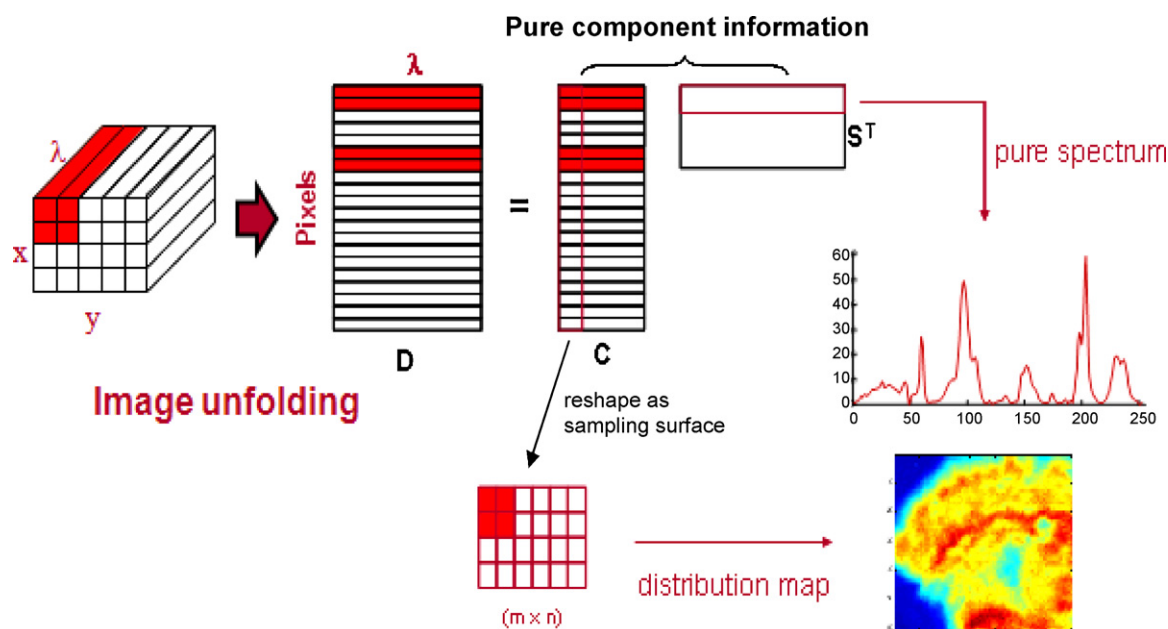


Fig. 3. Graphical representation of the bilinear model of a hyperspectral image.

- (4) Given \mathbf{D} and \mathbf{C} , calculation of \mathbf{S}^T under constraints.
- (5) Reproduction of \mathbf{D} from the product of \mathbf{C} and \mathbf{S}^T .
- (6) Go to step 3 until convergence is achieved.

The number of image constituents can be either known beforehand, or be determined by PCA on the whole image. The alternating optimization should always start by using the original preprocessed measurement, \mathbf{D} , and an initial guess of either the \mathbf{C} or the \mathbf{S}^T matrices. Typically, in images, the initial estimate is a \mathbf{S}^T matrix formed by pixel spectra picked up from the image according to previous knowledge (from pixels in areas of interest) or as a result of applying chemometric tools for purest pixel selection, such as SIMPLISMA [24].

The alternating least-squares steps 4 and 5 involve the operations $\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ and $\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$, respectively. The end of the iterative process takes place when the reproduction of the original image from the product of the resolved concentration profiles and spectra has enough quality and there is no significant variation among the results of consecutive cycles. The quality of the model MCR-ALS is measured with parameters such as the percentage of explained variance (r^2).

$$r^2 = 100 \times \left(1 - \frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2} \right)$$

where e_{ij} are the elements of the \mathbf{E} matrix and d_{ij} the elements of the raw data set \mathbf{D} . During the alternating least-squares steps, constraints are used to introduce information in the resolution process. In image analysis, non-negativity is the most commonly used constraint. Indeed, the concentration of any constituent in the image, as well as the spectroscopic Raman intensity in our example are, by nature, positive. As a consequence, elements in both \mathbf{C} and \mathbf{S}^T profiles should be positive [20,23,25]. Normalization of pure spectra in \mathbf{S}^T is also common to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization. Some equality constraints are also used in image analysis. The most obvious consists of including the knowledge of the identity (pure spectrum) of certain constituents. When this is the case, the spectral shapes of these constituents are fixed in the \mathbf{S}^T matrix during the iterative resolution process. The idea of taking into account the properties of the 2D or 3D pixel neighborhood is reflected in the local rank constraints, where the analyses performed to obtain this information are performed on the original pixel neighborhood areas or volumes [26]. Information about selective pixels (absence of all constituents but one) or, simply, about the absence of certain constituents in other pixels, is encoded in the \mathbf{C} matrix under the form of an equality constraint as well [27]. As in any other resolution analysis, constraints help to provide meaningful distribution maps and spectra and to decrease (or suppress) the ambiguity linked to the resolution results [20,23].

MCR-ALS results, i.e., distribution maps (\mathbf{C} matrix) and pure spectra (\mathbf{S}^T matrix) may be further used to obtain additional information. The use of the image information under the form of concentration profiles and pure spectra presents advantages over the use of the raw image. \mathbf{C} and \mathbf{S}^T are small meaningful and noise-filtered representations of the pixel and the spectral space of an image, respectively, and, besides, they store separately (in dyads of \mathbf{c}_i and \mathbf{s}_i^T profiles) the information of each of the image constituents.

The \mathbf{S}^T matrix is an excellent spectral basis for identification of image constituents when an external spectral library is available. In imitation with other target factor analysis approaches, each normalized library spectrum can be projected into the \mathbf{S}^T matrix following the next steps:

$$\mathbf{t}_i = \mathbf{S}\mathbf{r}_i$$

where \mathbf{t}_i is the library spectrum to be projected and \mathbf{r}_i , the transformation vector, which relates this spectrum to the space \mathbf{S}^T and is calculated as follows:

$$\mathbf{r}_i = (\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}\mathbf{S}^T\mathbf{t}_i$$

Once the transformation vector is obtained, the projection of the library spectrum onto \mathbf{S}^T is obtained as:

$$\mathbf{t}_0 = \mathbf{S}\mathbf{r}_i$$

and the difference between a library spectrum (\mathbf{t}_i) and its projection on \mathbf{S}^T , (\mathbf{t}_0) is quantified as:

$$e_i = \|\mathbf{t}_0 - \mathbf{t}_i\|$$

Once this operation is done for all the library spectra, the spectra for which the difference between the original spectrum and its projection on \mathbf{S}^T is lower (lower e_i) may be visually compared with the resolved spectra and identified. In this case, the fact that the \mathbf{S}^T matrix is formed by meaningful profiles and not by abstract scores, as in classical TFA approaches where PCA scores are used, provides an additional visual diagnostic for compound identification [5].

Quantitative information within an image would be actually best defined as the calculation of the percentage of the individual constituent signals over the global signal (designed $\mathbf{s.c.i}$) and can be done because the information of each image constituent is enclosed in a single dyad of profiles. As seen in the following equation, the numerator reproduces the signal of the i th constituent as the product of the dyad of profiles $\mathbf{c}_i\mathbf{s}_i^T$ whereas the denominator designs the global raw signal, $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ [5].

$$\mathbf{s.c.i} = 100 \times \frac{\sum \mathbf{c}_i\mathbf{s}_i^T}{\sum \mathbf{C}\mathbf{S}^T}$$

The use of the \mathbf{C} matrix as a meaningful compressed representation of the pixel space is particularly suitable for segmentation approaches, but this will be commented in more detail in the next section.

The MCR-ALS algorithm used has been coded by the authors and is freely downloadable with a user-friendly GUI [9] at www.mcrals.info.

3.3. Image segmentation

Segmentation techniques allow separating regions of the image based on pixel similarity. Pixels with similar spectra have necessarily similar composition, chemical and/or biological properties [14]. Image segmentation organizes pixels into classes. Knowing the spatial location of the different classes in the image and understanding the class properties (by studying their representative centroids) are the main goals of image segmentation.

Segmentation can be carried out by unsupervised methods, when prior information of the possible image groups or clusters is unavailable or by supervised methods, where prior knowledge about the expected groups is actively used. Likewise, hard or fuzzy approaches may be used, the former assigning every pixel to a single class and the latter allowing for pixels with partial degrees of membership in the different classes [14,15]. Segmentation methods are often applied in biomedical samples to distinguish healthy from non-healthy tissue or to detect sample regions with different properties [28,29]. In the example of this work, we have opted for using a hard unsupervised segmentation technique, K-means, since there is no prior information on the classes sought and a clearest definition of the classes (hard scheme) has been preferred.

K-means is an unsupervised segmentation method often used in the large image data sets since, as a partitioning clustering algorithm, is much less computationally heavy than hierarchical approaches

[17]. K-means assigns the n pixels in an image to a predefined number of k clusters by minimizing the following objective function:

$$\arg \min_{\mathbf{S}} \sum_{i=1}^k \sum_{\mathbf{x}_j \in \mathbf{S}_i} \|\mathbf{x}_j - \boldsymbol{\mu}_i\|^2$$

where \mathbf{S} refers to the class, \mathbf{x}_j accounts for a pixel spectrum and $\boldsymbol{\mu}_i$ for the spectrum of the centroid of its class. K-means works in an iterative manner by assigning every pixel to the group with the closest centroid until the segmentation scheme becomes stable. The algorithm steps as applied in this work can be summarized as follows:

1. Select the number of clusters, k .
2. Generate k initial centroids by DISTSLC algorithm [30].
3. Assign each pixel to the class of the closest centroid.
4. Recalculate new centroids from the groups formed.
5. Repeat steps 3 and 4 until stability of the segmentation scheme.

The main advantages of this algorithm are simplicity and speed; this is why it works so well for image data sets. A clear limitation, as for any other partitioning algorithm, is the decision on the number of clusters. This can be done by using different cluster validity indices, or giving priority to the interpretability of the classes formed [31]. In this work, we will use the Davies–Bouldin index [32] and the silhouette index [33] to test for the number of clusters since these indices are less sensitive to the presence of outlying or very detached pixels in the image than other indicators based on individual distances among pixels. The Davies–Bouldin (DB) index is defined as follows:

$$DB = \frac{1}{n} \sum_{i=1, i \neq j}^n \max \left(\frac{\sigma_i + \sigma_j}{d(c_i, c_j)} \right)$$

where n is the number of classes, σ_i is the average distance between all pixels in cluster i and its centroid, σ_j is the average distance between all pixels in cluster j and its centroid and $d(c_i, c_j)$ is the distance between the centroids (c) in cluster i and cluster j . The number of clusters that minimizes the DB index is taken as the optimal number of clusters. The silhouette is defined as:

$$s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max\{a(i), b(i)\}}$$

where $b(i)$ is the average dissimilarity of the i th pixel to all pixels in the closest cluster and $a(i)$ is the average dissimilarity of the i th pixel to all other pixels in the same cluster. The silhouette index is defined per each pixel. The average $s(i)$ for all the objects in a cluster is a measure of how tightly grouped the data in that cluster are. The average value for all clusters is taken as representative of the quality of the whole segmentation scheme. The higher the silhouette value, the better the clustering scheme.

In this work, the assumption made is that the number of classes must be, at least, equal or slightly higher than the number of image constituents, since classes may be formed by image regions of pure compounds or by constituent mixtures. In general, a compromise solution has been adopted between the number of clusters suggested by the indexes and the use of the interpretable segmentation scheme of smallest size.

Other segmentation algorithms could have been selected, but the main priority of this work is comparing the segmentation results obtained by different input pixel information, i.e., raw pixel spectra, PCA scores or MCR-ALS scores, and showing additional advantages linked to the use of MCR-ALS scores for segmentation approaches.

K-means has been used as implemented in the MIA Toolbox by Eigenvector Research. The silhouette index was calculated using the available routine in the MATLAB Statistics Toolbox. The Davies–Bouldin index was evaluated using an in-house coded routine.

4. Results and discussion

4.1. Resolution of hyperspectral image (MCR-ALS)

MCR-ALS was carried out on renal calculi. AsLS algorithm was applied to raw data of renal calculus A to remove the fluorescent contribution (see Fig. 2) whereas this kind of preprocessing was avoided in data from renal calculus B to prevent the removal of the signal of minor species. PCA analysis indicated the presence of three components on the AsLS-corrected data for renal calculus A and 4 components for the raw image of renal calculus B, one of them due to the background contribution.

SIMPLISMA was used in the generation of initial estimates to select the purest spectra in renal calculus A and the spectra of chemical contributions in renal calculus B. The estimate of the spectral background contribution for renal calculus B was obtained by AsLS as the background that would be subtracted to correct the mean spectrum of this image. In both images, resolution was carried out under the constraints of non-negativity in concentration profiles and spectra and with spectra normalization in matrix \mathbf{S}^T .

Fig. 4 shows the final results of distribution maps and pure spectra for renal calculus (A).

A first resolution was carried out and two of the resolved compounds were identified as whewellite (1) and wheddellite (2) by using a spectra reference library [34] and the procedure of identification described in Section 3.2 (see resolved spectra (black) and overlapped library spectra (red) in Fig. 5 for comparison). Fixing the library spectra of whewellite and wheddellite (equality constraint), a second MCR analysis was performed and the third compound could be identified as dahllite (3) (see Fig. 5). The explained variance of the final resolution was 97.3%. Applying the quantitation procedure described in Section 3.2, whewellite (1), wheddellite (2) and dahllite (3) were found to have signal contributions of 52.0%, 9.4% and 38.5%, respectively. A high overlap is seen in the distribution maps, more obvious for compound 3; hence, the larger difficulty in its resolution and identification. The resolution results are in agreement with the biomedical knowledge pointing out at the usual simultaneous presence of whewellite (i.e. $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and wheddellite (i.e. $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in certain types of kidney calculi [34].

Fig. 6a shows the final distribution maps of the three chemical constituents and the fluorescence contribution of renal calculus B. The background contribution is mainly present around the nucleus of the renal calculus. The identification of the chemical constituents was performed in this case by taking only the resolved spectra of the three chemical contributions as projection space. Constituents were identified as uric acid (1), whewellite (2) and mucin (3) although the identification of the latter was more difficult (see Fig. 7). Including the background as an additional contribution in the MCR analysis instead of performing a background correction of the raw image helped in the identification of major and minor species. Since the resolved spectra of the chemical species had some background contribution incorporated, a final resolution was performed by fixing the pure spectra of the three identified chemical compounds and leaving free the background contribution. The presence of minor species is clearly confirmed through the percentages of the different compounds. Thus, the background contribution accounts for 63.5% of the global signal, uric acid (35.4%), whewellite (0.4%) and mucin (1.0%). When relative percentages are computed excluding the background, uric acid (96.2%), whewellite

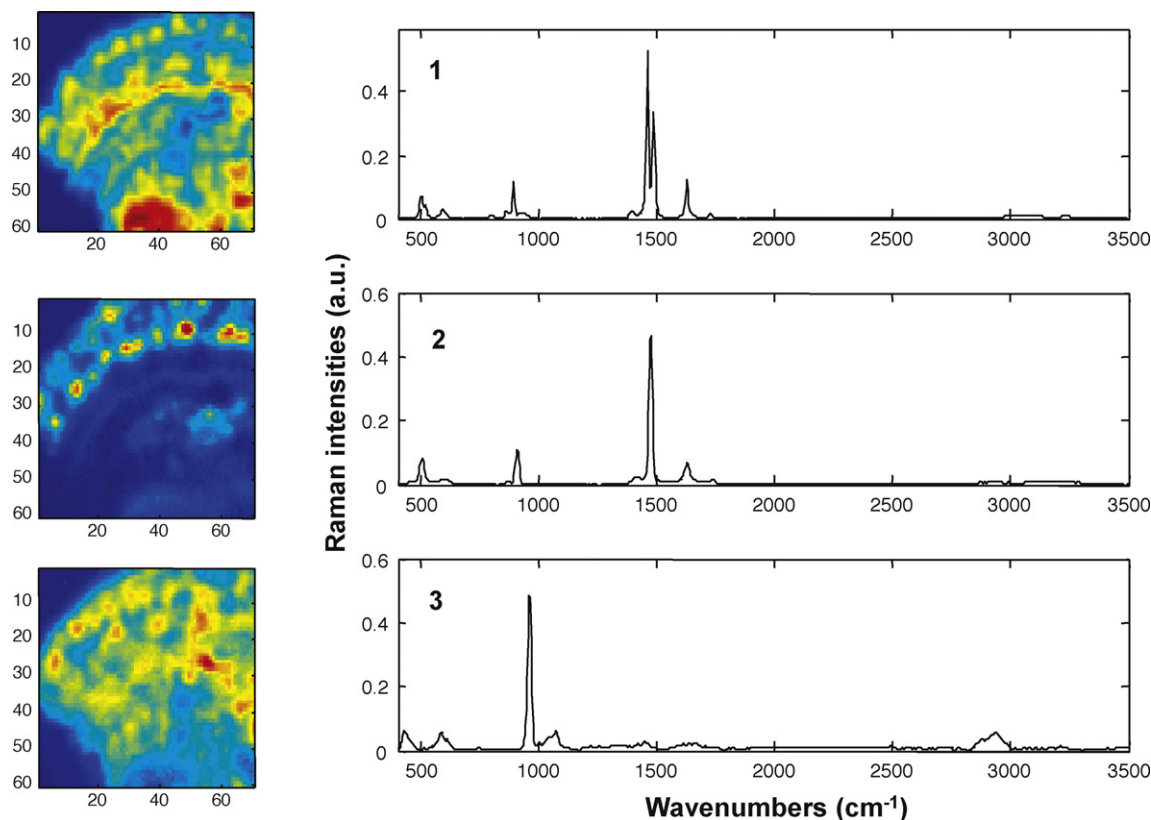


Fig. 4. MCR-ALS resolution results for renal calculus A. *Left plots:* distribution maps. *Right plots:* related pure spectra. *Compound indices:* 1 (whewellite), 2 (weddellite), 3 (dahlite).

(1.1%) and mucin (2.7%). This calculus has a very different composition from calculus A. Although the identification of mucin is not conclusive, it could be supported by the fact that this protein is linked to controlling kidney calculi formation and, being a protein, also provides a much higher fluorescent contribution, as can be seen in the background map in the dominant zones of this chemical constituent.

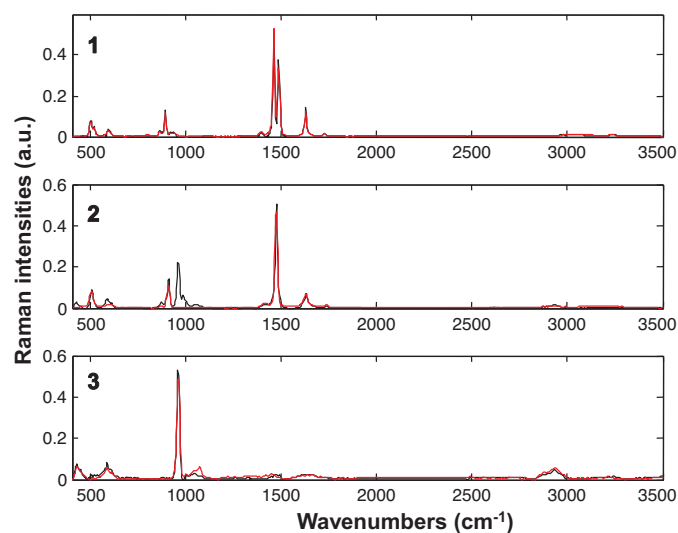


Fig. 5. Identification of chemical constituents of renal calculus A. Resolved spectra (black) and library spectra (red). Compound indices as in Fig. 4. Identification of compounds one and two comes from the first MCR-ALS resolution; identification from compound three comes from the second MCR-ALS analysis, where library spectra of whewellite and weddellite have been fixed. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

4.2. Image segmentation

K-means was applied to renal calculus A using the raw image measurement, PCA scores and MCR scores (C matrix). To assess the number of necessary clusters, cluster validity indices were evaluated for segmentation schemes built using different number of clusters. Fig. 8 shows the evolution of DB index and silhouette index for the different input information used in the segmentation scheme. Reminding that DB should be minimum and silhouette maximum, indications on 2 or, at the most three clusters, are suggested in all cases. Since we mentioned in Section 3.3 that the minimum number of classes would be equal to the number of compounds, we opted for segmentation schemes performed with three classes.

Actually, cluster validity indices for schemes performed with raw data and PCA scores are better for schemes with two clusters than with three. This is due to the high similarity between the pure spectra of whewellite and weddellite, which clearly affects the scheme built with the raw data and does affect indirectly the one obtained with PCA, where PCs are linear combinations of the contributions of the image compounds. This fact hinders the modeling of a third segmentation class. Instead, cluster indices for schemes based on MCR scores are not significantly different for schemes with two or three classes, since the pure spectra of two of the compounds may be similar, but not their related distribution maps, which are built from the refolded MCR scores. The larger differences among the MCR scores among pixels, as compared with the differences among PC score values or raw spectra, facilitate the distinction of a third class in the segmentation scheme based on MCR scores.

Results of segmentation from raw data, PCA scores and MCR scores of renal calculus A are in Fig. 9a–c, respectively. Left plots represent the segmentation scheme, i.e., the distribution map of

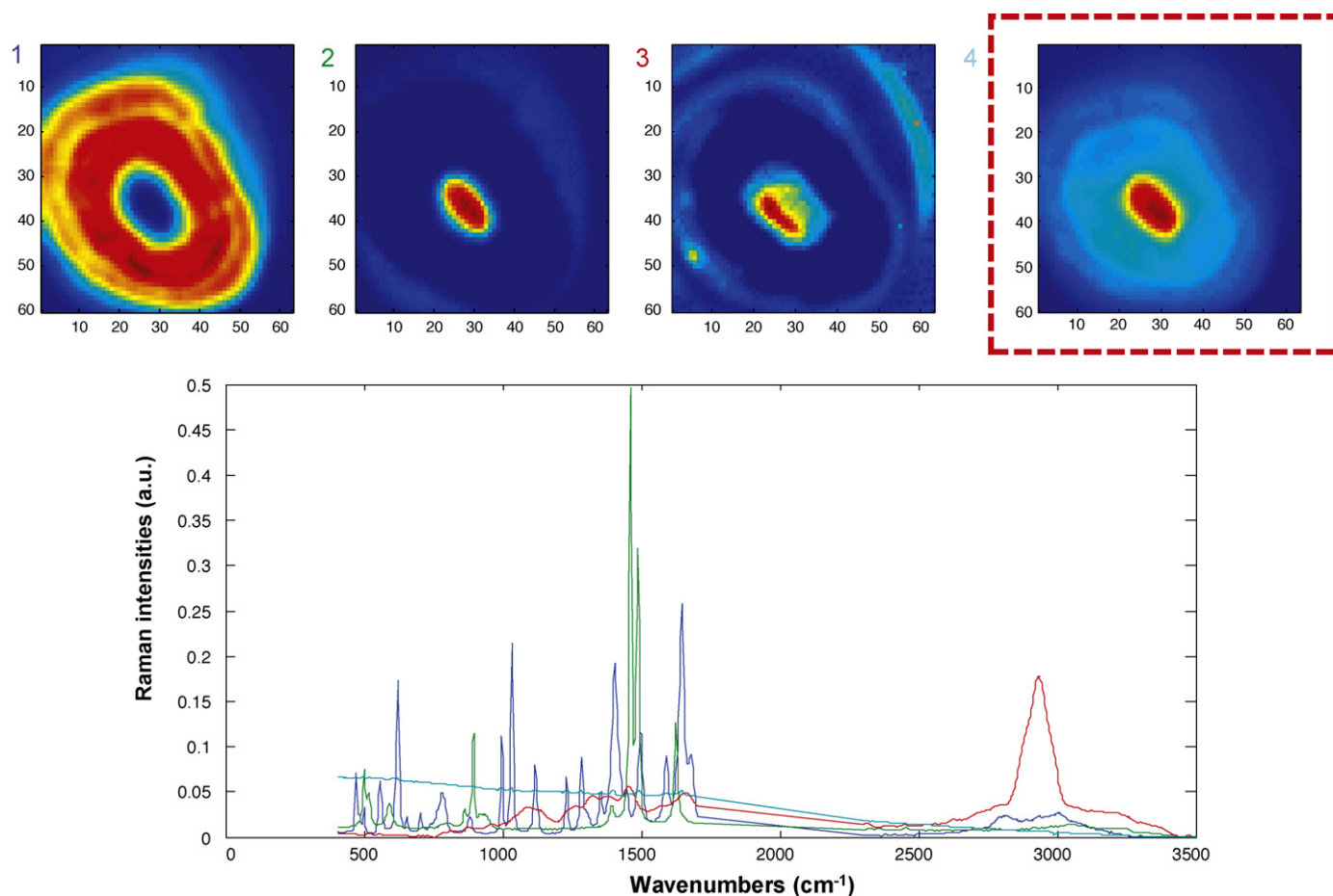


Fig. 6. MCR-ALS of resolution results of renal calculus B. (a) Distribution maps of 3 chemical components (1, 2, 3) and of the background contribution (4), (b) Related pure spectra. Compound indices and colour code: 1, blue (uric acid), 2, green (whewellite), 3, red (mucin), 4, cyan (background). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the different clusters in the image. Right plots display the centroids, i.e., the mean spectra, mean PCA scores or mean MCR scores related to each class of the related segmentation scheme.

The first conclusion that can be drawn is the similarity in the different segmentation schemes obtained by using the three different representations of the pixel space. For the case of raw data, computation is longer since the full corrected spectra are used as pixel representations. The centroids (mean spectra of classes) are chemically meaningful, but they are very similar to each other; partly because of the similarity of the pure spectra of some of the image constituents (see Fig. 9a, right plot). This fact hinders a clear understanding of the characteristics of each segmentation class and segmentation classes seem to be a bit more mixed spatially than the analogous representations obtained by PCA and MCR scores.

Segmentation schemes based on the use of scores of PCA and scores of MCR-ALS (Fig. 9b and c, left plots) are extremely similar, which proves that both pixel representations contain the same image information. The dimension reduction (use of three score values to define every pixel as compared with more than 700 channels in the raw spectra) and the fact that both kind of scores are noise-filtered representations of the image (i.e., most noise is left in the **E** matrix in PCA and MCR bilinear models) speeds up the computation and improves the definition of clusters in the segmentation analysis. However, it is difficult to interpret the meaning of centroids coming from PCA scores because these composition-related values are abstract and lack chemical sense. At this point, it is worth reminding one of the main advantages of using MCR-ALS scores (**C**

matrix), which is the fact that these scores are small and, above all, meaningful basis of the pixel space.

Segmentation results using MCR-ALS scores of renal calculus A are in Fig. 9c. In this case, the centroids are more interpretable and it is possible to know which component or mixture of components is represented in each cluster. For example, whewellite (c1) is almost absent in classes A and C, confirming the presence of this compound mainly in class B, located in the outer part of the stone. This class has the most mixed composition and presents overlap of the three compounds in the mixture, whereas classes A and B can be considered mostly as binary mixtures of whewellite and dahllite, where the former is more dominant in class A and the latter in class C. We should remind that centroids are mean representations of the class and, therefore, we should not exclude the presence of some few pure pixels in each of the classes defined.

Another relevant observation is that the resolution and the segmentation results obtained by using MCR-ALS information are different, as can be easily seen comparing the distribution maps in Fig. 4 and the segmentation scheme in Fig. 9c (left plot). Segmentation classes can be potentially formed by pure compound pixels or by pixel mixtures, whereas distribution maps from resolution refer always to the distribution of each pure image constituent. In our example, since image constituents overlap, classes are mainly formed by pixels with constituent mixtures of different composition.

Until now, we have seen some of the advantages of using MCR scores for image segmentation, namely:

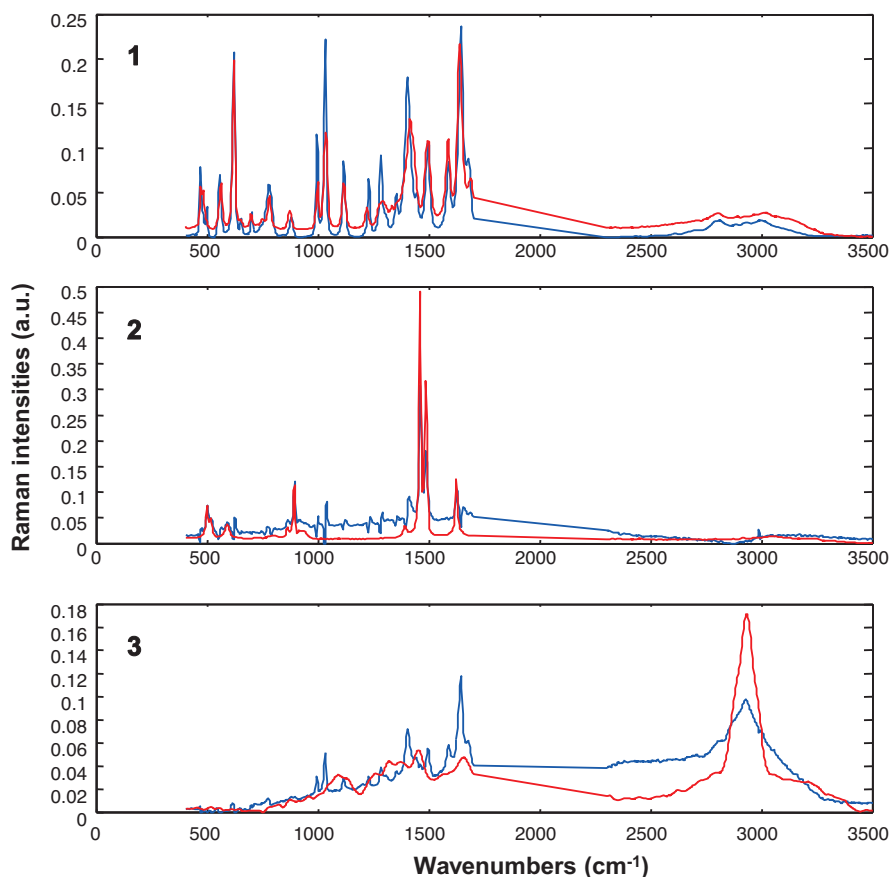


Fig. 7. Identification of chemical constituents of renal calculus B. Resolved spectra (blue) and library spectra (red). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

- MCR scores are noise-filtered small representations of the pixel space that retain the relevant information on the original image.
- MCR scores are chemically meaningful and, therefore, segmentation results are more easily interpretable.

In view of these facts, we have applied K-means to renal calculus B only taking as starting information the related MCR scores. In this case, an additional advantage of MCR scores will be stressed:

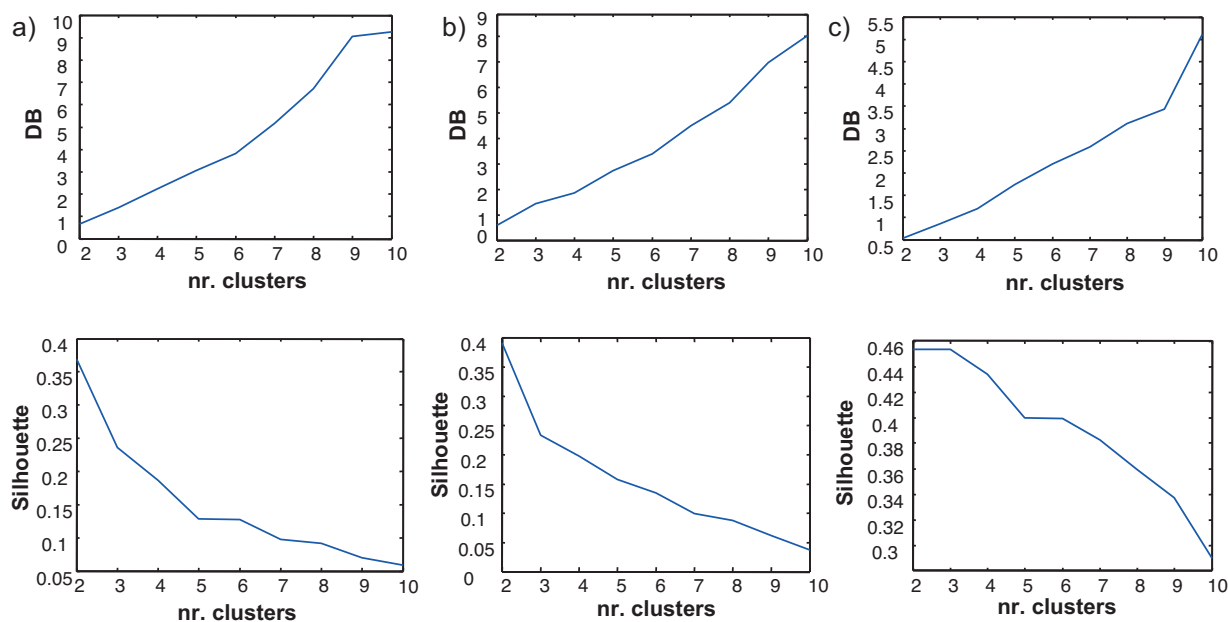


Fig. 8. Evolution of validity cluster indices as a function of number of clusters in the segmentation scheme. *Top plots:* Davies–Bouldin index. *Bottom plots:* silhouette index. (a) Results from segmentation on raw data, (b) Results from segmentation on PCA scores, (c) Results from segmentation on MCR-ALS scores.

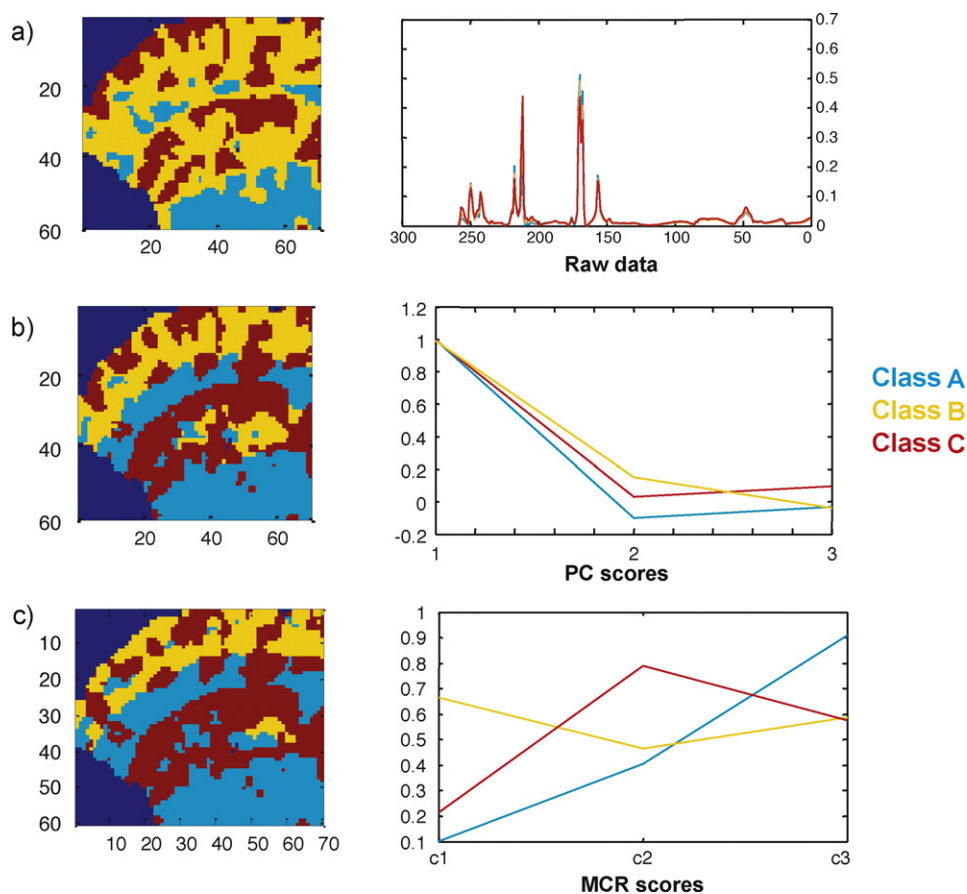


Fig. 9. Segmentation results of renal calculus A. *Left plots:* segmentation schemes; *right plots:* centroid profiles. The same colour is used for the class in the segmentation scheme and in the related centroid profile. (a) Segmentation results from raw data, (b) Segmentation results from PCA scores, (c) Segmentation results from MCR-ALS scores (c1, whewellite score; c2, weddellite score and c3, dahllite score).

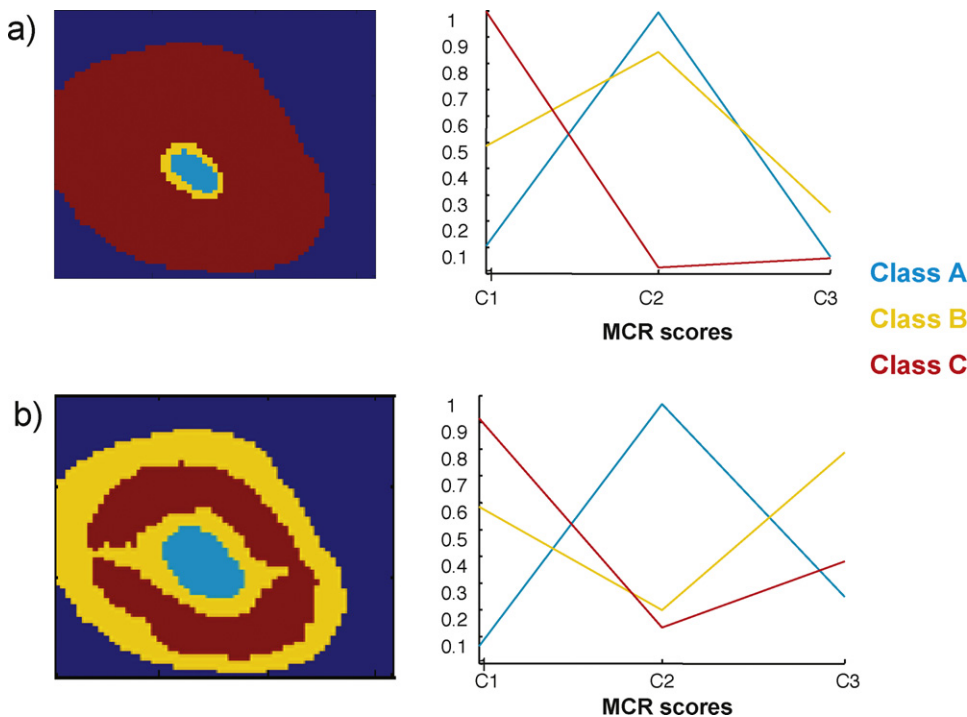


Fig. 10. Segmentation results from MCR-ALS scores of renal calculus B. *Left plots:* segmentation schemes; *right plots:* centroid profiles. The same colour is used for the class in the segmentation scheme and in the related centroid profile (c1, uric acid score; c2, whewellite score; c3, mucin score). (a) Segmentation results from raw MCR-ALS scores, (b) segmentation results from autoscaled MCR scores.

- MCR scores contain the information of image constituent in separate profiles.

Indeed, this advantage is first noticed in the capability to select the information to be included in the segmentation process. In this case, we have only selected the three concentration profiles related to chemical constituents (uric acid, whewellite and mucin) for segmentation purposes and the background contribution has been left aside. Like for the previous example and considering the results of the clustering indices, segmentation schemes with a number of clusters equal to the number of species have been selected. Fig. 10a shows the segmentation results taking the MCR scores previously described.

Three classes are found, where class C is almost exclusively formed by uric acid (c1) in the external part of the stone, class A in the nucleus of the stone has a mixed composition, but with a dominance of whewellite and class B, very small, between A and C, has the three compounds present. This segmentation scheme reflects the classes that can be detected in the stone based on the absolute abundance of the compounds in the pixels. In this kind of scheme, compounds with high pixel concentrations, such as uric acid, major and located in the outer part of the stone, and whewellite, minor but located in the center of the stone, drive the configuration of the segmentation scheme.

Often, as in other data analysis methods, there may be a need to balance the importance of all variables used in the segmentation scheme. In this case, it means that we may want a segmentation scheme where potentially all stone compounds (with high and low pixel concentration levels) have an equally relevant role, i.e., where the relative presence of all of them in the stone be the driving force of the segmentation scheme. In this case, the selected profiles in the **C** matrix must be autoscaled. Again, this pretreatment has the sought effect because the constituent information is separated in profiles; if the contribution of minor compounds was mixed in the raw signal or in combined abstract scores, the importance of minor compounds would not be enhanced so efficiently after pretreatment. The results of segmentation on autoscaled **C** profiles are shown in Fig. 10b. Now mucin (c3) has a major presence in the centroid profiles; so, the role of this minor compound is more clearly understood. Now, classes take into account pixel similarities in relative abundance terms. Still, classes A and C show dominance of uric acid and whewellite, respectively, and low relative presence of other compounds. Class B should be interpreted as the class that displays the image zones where the minor compound mucin (c3) is most present, but not in absolute concentration terms. This class, which now expands to larger zones of the stone, has a clear mixed character, which helps to understand why when absolute abundances were considered, this class was very small and most of the pixels were incorporated in classes where other compounds were more dominant.

5. Conclusions

MCR-ALS has been proven to be an efficient method for hyperspectral image resolution and to provide input information for segmentation purposes. Different resolution protocols on background-corrected data or introducing the background as an additional contribution in the resolution process have been proposed for images with only major constituents and images with major and minor constituents, respectively.

Concentration profiles and pure spectra obtained by MCR-ALS are excellent low dimension, noise-filtered meaningful basis of the pixel space and the spectral space of the image, respectively. In the resolution field, this fact allows for tasks of identification and quantitation of image constituents.

In segmentation, the use of concentration profiles (MCR scores) provides a small representation of the pixel space, speeding up the segmentation process. The meaningfulness of MCR scores helps also in the interpretation of the centroid properties, taken as abundances of the image constituents in each segmented class. Another interesting feature of the MCR scores is that the information of each image constituent (chemical or not) is separated in distinct profiles. This provides a flexible selection of the profiles to be input in the segmentation scheme and allows taking profiles of chemical constituents and ignoring background contributions. Segmentation schemes can also be built taking into account the pixel similarities in terms of absolute abundance of image constituents (raw concentration profiles) or enhancing the role of minor constituents in the segmentation by autoscaling profiles and working with similarities of constituent abundance in relative terms.

Once proven the usefulness of MCR scores and loadings for other image analysis purposes, such as identification, quantitation and segmentation, it is worth stressing the complementary information provided by segmentation and resolution results. Whereas segmentation is often used in biomedical studies, Multivariate Curve Resolution has not often been applied to data obtained in this field. Resolution can help not only to make segmentation classes more interpretable, but also to give a separate view of how each particular biological constituent (interpreted as any molecule or entity having a distinct spectral signature) spreads in the biological sample, which is a different information than the one provided by segmentation schemes, where classes may belong to a pure contribution or to a mixture of them.

Acknowledgements

We acknowledge funding from Spanish government (grant CTQ2009-11572 and PhD grant for S. Piqueras). The authors of this work belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2009 SGR 45).

References

- [1] P. Geladi, H. Grahn, *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis*, Wiley, Chichester, UK, 1996.
- [2] M.D. Schaeberle, H.R. Morris, J.F. Turner, P. Treado, *Anal. Chem.* 71 (1999) 175A–181A.
- [3] E.N. Lewis, J. Dubois, *Am. Lab.* 40 (2008) 18.
- [4] M.B. Sinclair, D.M. Haaland, J.A. Timlin, H.D.T. Jones, *Appl. Optics* 45 (2006) 3283–3291.
- [5] A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, L. Duponchel, R. Tauler, in: R. Salzer, H.W. Siesler (Eds.), *Chemometric Tools for Image Analysis in Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Wiley-VCH, 2009, pp. 65–106.
- [6] A. Nijssen, T.C. Bakker, T.C. Schut, F. Heule, P.J. Caspers, D.P. Neumann, M.H.A.G.J. Puppels, *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 64–69.
- [7] H. Fabian, N.A.N. Thi, M. Eiden, P. Lasch, J. Schmidt, D. Naumann, *Biochim. Biophys. Acta* 178 (2006) 874–882.
- [8] L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne, *J. Chem. Info. Comput. Sci.* 43 (2003) 2057–2067.
- [9] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 70–79.
- [10] N.B. Gallagher, J.M. Shaver, E.B. Martin, J. Morris, B.M. Wise, W. Windig, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 105–117.
- [11] T.M. Hanczewicz, J.H. Wang, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005) 18–31.
- [12] J.M.P. Nascimento, J.M. Bioucas-Dias, *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 43 (2005) 898–910.
- [13] M. Berman, A. Phatak, R. Lagerstrom, B.R. Wood, *J. Chemometr.* 23 (2009) 101–116.
- [14] T.N. Tran, R. Wehrens, L.M.C. Buydens, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005) 3–17.
- [15] D.L. Massart, L. Kaufman, *The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1983.
- [16] B.S. Everitt, S. Landau, M. Leese, *Cluster Analysis*, E. Arnold, London, UK, 2001.
- [17] S.P. Lloyd, *IEEE Trans. Info. Theor.* 28 (1982) 129–137.
- [18] T.N. Pappas, *IEEE Trans. Sign. Process.* 40 (1992) 901–914.
- [19] P. Eilers, *Anal. Chem.* 76 (2004) 404–411.
- [20] R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski, *J. Chemometr.* 9 (1995) 31–58.
- [21] R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133–146.

- [22] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101–110.
- [23] A. de Juan, R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163–176.
- [24] W. Windig, J. Guilment, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432.
- [25] R. Bro, S. De Jong, J. *Chemometr.* 11 (1997) 393–401.
- [26] A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005) 64–74.
- [27] A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, J. *Chemometr.* 22 (2008) 291–298.
- [28] L. Zhang, G.W. Small, A.S. Haka, L.H. Kidder, E.N. Lewis, *Appl. Spectrosc.* 57 (2003) 14–22.
- [29] P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann, M. Diem, *Biochim. Biophys. Acta: Mol. Basis Dis.* 1688 (2004) 176–186.
- [30] N.B. Gallagher, J.M. Shaver, E.B. Martin, J. Morris, B.M. Wise, W. Windig, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 105–112.
- [31] T.N. Tran, Including spatial information in clustering of multi-channel images, PhD Thesis, 2005, pp. 47–48, ISBN:90-9019787-7 (Chapter 4).
- [32] D.L. Davies, D.W. Bouldin, *IEEE Trans. Pattern. Anal. Mach. Intell.* 2 (1979) 224–227.
- [33] P.J. Rousseeuw, *J. Comput. Appl. Math.* 20 (1987) 53–65.
- [34] N.Q. Dao, M. Daudon, *Infrared and Raman Spectra of Calculi*, Elsevier, 1997.

5.1.1 Discussió dels resultats

En aquesta secció es presenta una discussió general del procediment de treball proposat en l'article. L'objectiu general d'aquests treball és:

- Dur a terme la resolució individual d'una imatge Raman pel mètode de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS) i proposar un postprocessat dels resultats de resolució per al disseny d'un protocol metodològic que permeti la identificació i quantificació dels components i la segmentació de la imatge.

5.1.1.1 Resolució pel mètode MCR-ALS

Es va realitzar l'anàlisi individual d'una imatge Raman prenent com exemple l'estudi de dos talls de càlcul renal representatius d'imatges amb components majoritaris i minoritaris. El primer pas de l'anàlisi va consistir en examinar les dades originals, on es va observar la presència de línies de base de formes irregulars i pronunciades en els espectres Raman d'ambdues mostres degut a la contribució de fluorescència. La contribució de fluorescència pot arribar a emascarar les bandes Raman, ja que la intensitat és igual o superior a la dispersió Raman (vegeu figura 4.2.1.1.1 corresponent a la secció de la correcció de la línia de base i de la distorsió del senyal). Existeixen diferents tractaments quimiomètrics capaços d'eliminar la contribució de fons de fluorescència. En general, els algoritmes de correcció de contribució del senyal de fons en espectroscòpia Raman es basen en l'ajust polinòmic ¹⁻⁵, transformacions de *wavelet* ^{6,7} i derivades ^{2,8,9}. Per primer cop en aquest treball s'ha adaptat el mètode de correcció de línia de base de mínims quadrats asimètrics, AsLS ¹⁰ per a l'eliminació de fluorescència en imatges hiperespectrals Raman.

La correcció de la contribució de fluorescència tan sols es va dur a terme per al càlcul renal (A), representatiu d'imatges amb components majoritaris. Es va decidir no corregir la contribució del senyal de fons per al càlcul renal (B) perquè no es podia assegurar una bona diferenciació entre el senyal de les espècies minoritàries i la contribució de fluorescència. En la figura 4.2.1.1.1a es mostren els espectres Raman originals per al càlcul renal (A), mentre que a la figura 4.2.1.1.1b,

s'observen els espectres després de la correcció AsLS (ambdues figures corresponen a la secció 4.2.1.1).

Després del pretractament de les dades, l'anàlisi prossegueix amb l'aplicació del mètode de resolució multivariant de corbes per a la descomposició de la matriu original en els perfils de concentració (mapes de distribució) i espectres purs dels constituents de la imatge. Es van seguir els passos del mètode MCR-ALS descrits en l'apartat 4.4. Primer es va determinar el nombre de components, ja que no es disposava de cap tipus d'informació prèvia de cap de les mostres mitjançant la descomposició de les dades en valors singulars. A partir de la representació gràfica dels valors singulars es van determinar tres components per al càlcul renal (A) i quatre components per al càlcul renal B. Dels quatre components del càlcul renal (B), tres corresponen a espècies químiques i un està associat a la contribució del senyal de fluorescència. L'estructura del senyal de fons es va incorporar a l'anàlisi de resolució com un component més per tal de poder separar la informació química (corresponent a la presència d'espècies majoritàries i minoritàries) del soroll (vegeu figura 5.1.1.1.1).

Un cop determinat el nombre de components per a cadascun dels talls, es van elaborar les estimacions inicials per a cadascuna de les matrius (\mathbf{S}^T) mitjançant un mètode basat en SIMPLISMA¹¹. Es van seleccionar tres espectres purs per als dos càlculs renals. Per a l'anàlisi del càlcul renal (B) es va incorporar un senyal addicional corresponent a la contribució de fons. L'espectre de la contribució de fluorescència es va obtenir a partir de la resta de l'espectre mitja de la imatge del càlcul (B) i de la seva versió corregida mitjançant AsLS.

Finalment una vegada determinat el nombre d'espècies i elaborades les estimacions inicials per a cadascuna de les mostres es va dur a terme la resolució MCR-ALS. L'anàlisi es va efectuar sota les restriccions de no-negativitat en la direcció dels espectres (\mathbf{S}^T) i en la direcció dels perfils de concentració (\mathbf{C}) i també es va aplicar la normalització dels espectres de la matriu \mathbf{S}^T per a evitar fluctuacions d'intensitat en els perfils durant els processos de resolució. En la figura 5.1.1.1.1 es poden observar els resultats MCR-ALS per a ambdues imatges.

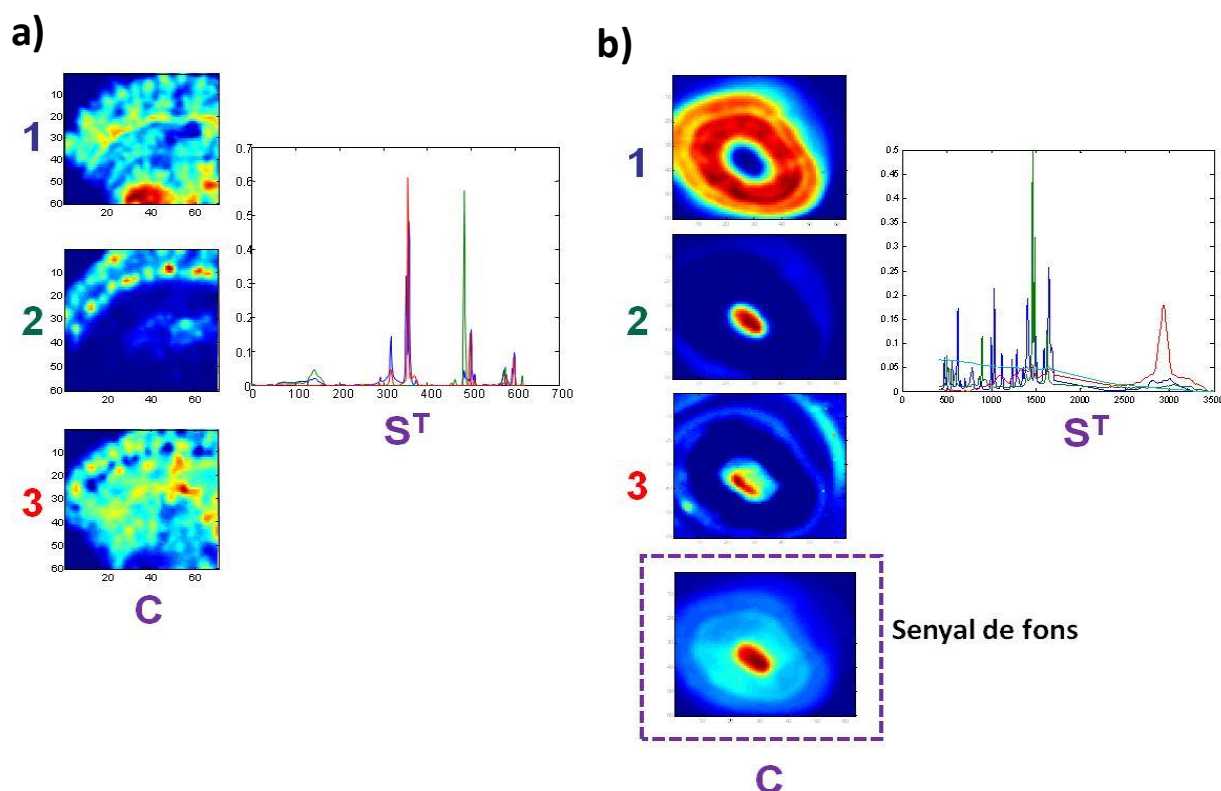


Figura 5.1.1.1.1 Resultats de l'anàlisi de resolució MCR-ALS. **a)** Mapes de distribució i espectres purs del càlcul renal (A). **b)** Mapes de distribució i espectres purs del càlcul renal (B). El mapa de distribució requadrat en violeta correspon a la contribució de fluorescència.

5.1.1.2. Postprocessat dels resultats de resolució. Identificació dels components, quantificació i segmentació.

Els mapes de distribució i els espectres purs resolts mitjançant el mètode MCR-ALS poden ser emprats per a obtenir diferents tipus d'informació química. Els resultats de la resolució són representacions reduïdes de les dades originals, que descriuen adequadament l'espai de concentracions i d'espectres purs dels constituents del sistema. A més a més, la informació de cada constituent de les matrius de concentracions i espectres purs es troba separada de la resta, en els seus perfils específics. Respecte altres algorismes d'anàlisi, com per exemple el PCA, les representacions dels perfils de concentracions i espectres purs són fàcilment interpretables ja que les restriccions emprades durant el mètode de resolució aporten sentit químic als resultats. Gràcies a aquestes característiques, els resultats MCR-ALS poden ser utilitzats posteriorment per

a la identificació dels constituents de la imatge, la detecció d'agrupacions de píxels amb característiques similars (segmentació) o la recuperació d'informació quantitativa (vegeu figura 5.1.1.2.1) .

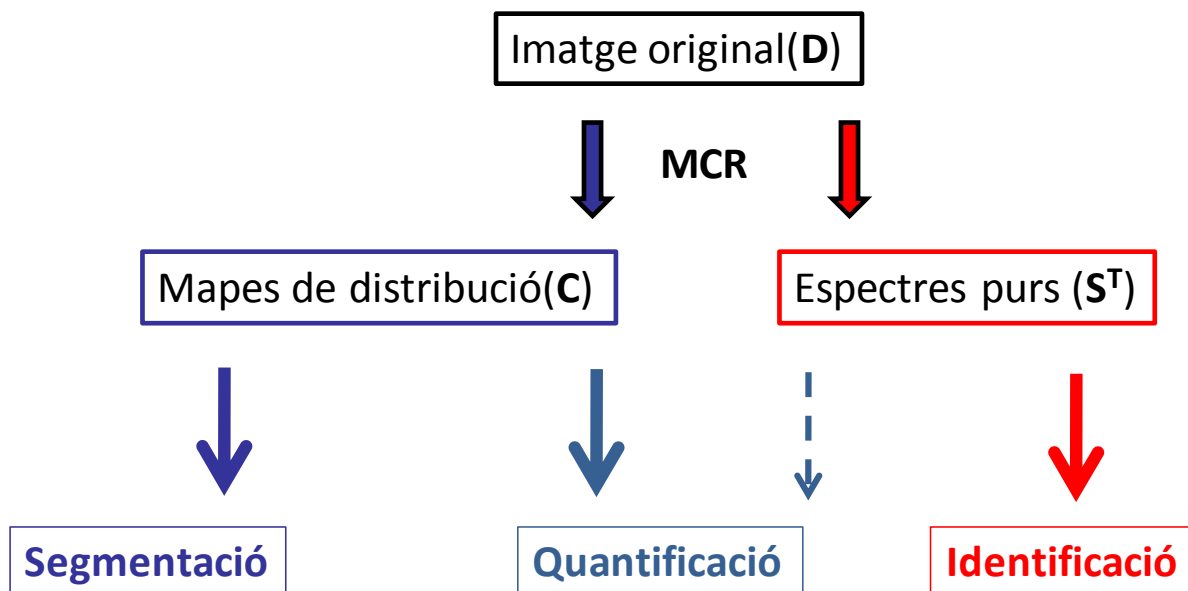


Figura 5.1.1.2.1 Esquema representatiu sobre l'ús dels resultats MCR-ALS per a la segmentació de la imatge, quantificació i identificació dels constituents presents en la mostra.

En aquest treball s'ha desenvolupat una sèrie de procediments de postprocessat de la imatge a partir dels resultats obtinguts pel mètode MCR-ALS, que inclouen la identificació i quantificació dels constituents i la segmentació de la imatge.

La identificació dels components purs es basa en l'ús combinat dels espectres resolts obtinguts en l'anàlisi MCR-ALS (matriu S^T) i de la informació inclosa en biblioteques d'espectres. Les biblioteques d'espectres són molt grans i necessiten mètodes de cribatge per a identificar els possibles compostos presents en la imatge. La correspondència entre els espectres resolts i els espectres de la biblioteca no té perquè ser exacta, degut a l'ambigüitat en els resultats que pot presentar el mètode de resolució MCR-ALS. Tot i així, la matriu d'espectres resolts és una molt bona interpretació de l'espai de variació espectral de les dades originals. Des d'un punt de vista geomètric, això significa que la matriu d'espectres purs descriu l'espai espectral de la imatge, de manera que els espectres de la biblioteca relacionats amb els constituents de la imatge han de

pertànyer aquest espai. El mètode de *screening* que s'utilitza consisteix en la projecció dels diferents espectres de la biblioteca, degudament normalitzats, en l'espai definit per la matriu resolta d'espectres purs (\mathbf{S}^T)¹². En el cas d'una imatge amb dos constituents (figura 5.1.1.2.2a) la matriu \mathbf{S}^T definiria un pla i els espectres de la biblioteca que fossin els constituents de la imatge hi estarien inclosos. Per a realitzar aquesta projecció, es calcula primer un vector de projecció \mathbf{r}_i , que relaciona l'espectre de la biblioteca normalitzat \mathbf{t}_i , amb l'espai definit per \mathbf{S}^T de la següent manera:

$$\mathbf{t}_i = \mathbf{S} \mathbf{r}_i \quad \text{Equació 5.1}$$

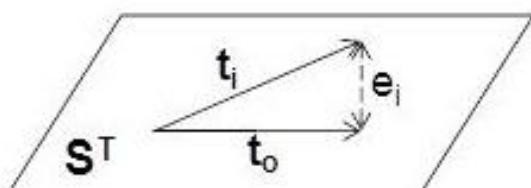
$$\mathbf{r}_i = (\mathbf{S} \mathbf{S}^T)^{-1} \mathbf{S}^T \mathbf{t}_i \quad \text{Equació 5.2}$$

Després s'obté la projecció de l'espectre de la biblioteca en l'espai definit per \mathbf{S}^T com segueix:

$$\mathbf{t}_0 = \mathbf{S}^T \mathbf{r}_i \quad \text{Equació 5.3}$$

Quan l'espectre de la biblioteca \mathbf{t}_i i la seva projecció en l'espai definit per \mathbf{S}^T , \mathbf{t}_0 , són idèntics o molt semblants, el candidat és un constituent present en la imatge. Geomètricament, això vol dir que la distància (\mathbf{e}_i) entre l'espectre de la biblioteca (\mathbf{t}_i) i el pla definit per \mathbf{S}^T , on es troba la seva projecció (\mathbf{t}_0), és nul·la o molt petita. Per tant el valor de $\mathbf{e}_i = \|\mathbf{t}_0 - \mathbf{t}_i\|$, s'utilitza per a conèixer els candidats potencials a ser els constituents de la imatge. La figura 5.1.1.2.2b mostra els valors d' \mathbf{e}_i de tots els espectres de la biblioteca de compostos freqüents en càlculs renals per al càlcul (A). S'observa com alguns candidats de la biblioteca presenten valors d' \mathbf{e}_i baixos respecte a la resta d'espectres. Aquests són els que presenten major possibilitat de ser un constituent de la imatge analitzada. Un cop aquesta selecció prèvia s'ha dut a terme, és generalment senzill saber quins són els constituents de la imatge per comparació visual dels espectres de la biblioteca preseleccionats i els espectres resolts, que tenen significat químic.

5.1.1.2.2 a)



5.1.1.2.2 b)

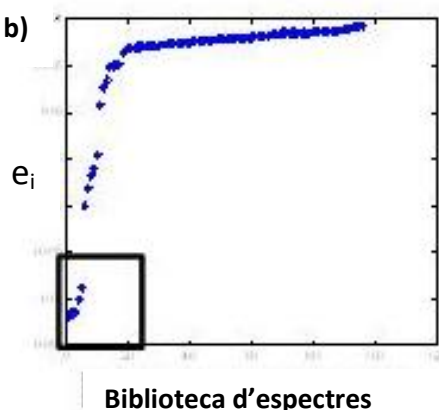


Figura 5.1.1.2.2 a) Representació de la projecció de l'espectre de la biblioteca, t_i , en l'espai definit per S^T . t_o és l'espectre resultant de la projecció. **b)** Representació de les distàncies que presenten cadascun dels espectres de la biblioteca t_i respecte l'espai definit per S^T , t_o . Enquadrats es troben els valors d' e_i que podrien correspondre a constituents de la imatge.

Un cop s'han identificat algunes o totes les espècies, es pot resoldre de nou la imatge utilitzant una restricció d'igualtat, en què es fixen les formes dels espectres de la biblioteca identificats. Així s'aconsegueixen uns resultats més acurats, es facilita la identificació de compostos que encara fossin dubtoses i s'obtenen uns mapes de distribució més ben definits.

Encara que l'estudi de les imatges hiperespectrals se centri en el coneixement de la composició química de la mostra i la distribució dels components, hi ha possibilitats d'utilitzar aquesta informació per a l'anàlisi quantitativa. Quan es treballa amb una única imatge, la quantificació de les espècies presents (sci) es defineix com el percentatge de la contribució del senyal de cada espècie sobre el senyal espectral total de la imatge i es calcula mitjançant l'equació que es mostra a continuació ¹²:

$$sci = \frac{\sum_{i,j} c_i s_i^T}{\sum_{i,j} c s^T} \times 100$$

Equació 5.4

on, $(\mathbf{c}_i \mathbf{s}_i^T)$ és el senyal individual de cadascun dels constituents i $(\mathbf{C} \mathbf{S}^T)$ és la contribució del senyal global (vegeu figura 5.1.1.2.3). Cal especificar que aquest tipus de quantificació intramatge és una aproximació, ja que assumeix implícitament que la intensitat unitària del senyal de tots els components (absortivitat) es idèntica. De forma estricta, cal parlar de contribució del senyal i no de quantificació.

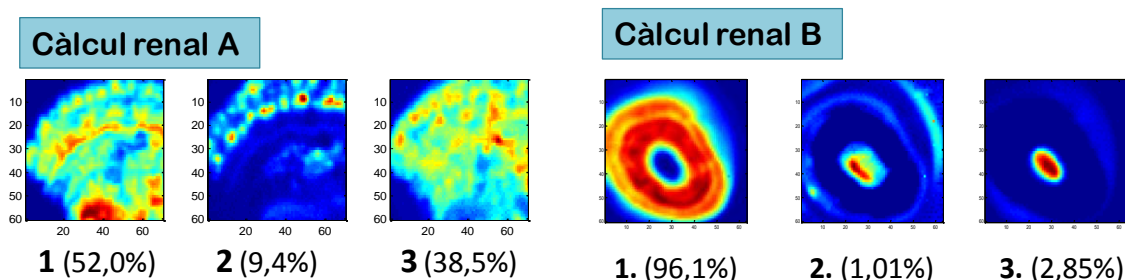
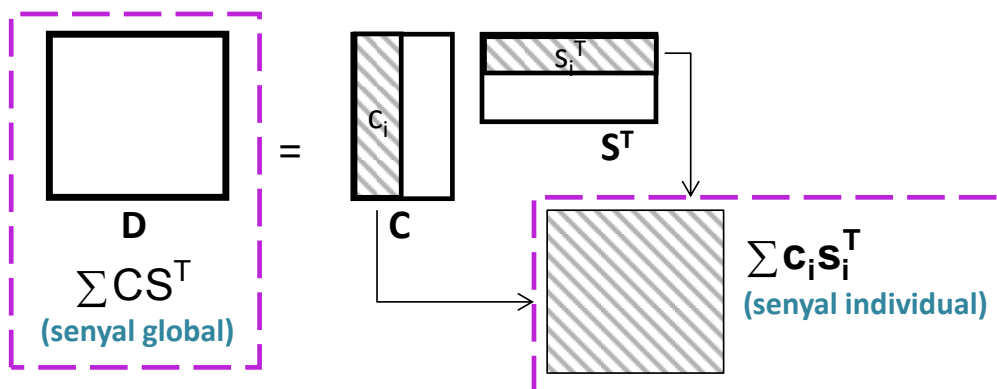


Figura 5.1.1.2.3 Representació de l'obtenció d'informació quantitativa mitjançant el mètode MCR-ALS per a una imatge. A la part inferior de la figura es mostren els mapes de distribució i la seva respectiva contribució del senyal per a cadascun dels constituents químics dels càlculs renals A i B.

Finalment, la segmentació d'una imatge és un procediment rellevant, ja que permet interpretar la informació espacial de manera conjunta en un sol mapa de segmentació que agrupa píxels en classes segons la seva similitud ¹³. Existeixen diferents algorismes de segmentació que es classifiquen en diverses tipologies, tal i com ja s'ha explicat en l'apartat 4.4. La informació de partida en una anàlisi de segmentació d'imatges sol ser els espectres dels píxels, la forma dels quals està relacionada amb la seva composició, però els mètodes de segmentació es poden aplicar a partir d'altres tipus d'informació de partida que representin les característiques dels

píxels originals. Ateses les grans dimensions d'una imatge hiperespectral, resulta més eficaç l'ús de representacions comprimides de la informació dels píxels que continguin la informació rellevant necessària per descriure les dades originals, per exemple, l'ús dels *scores* de PCA ¹⁴. En aquest treball s'ha volgut proposar l'ús de la matriu de concentracions que s'obté després d'aplicar el mètode de resolució com a informació de partida per a l'anàlisi de segmentació, que podríem definir com els *scores* MCR. L'ús de la matriu **C** permet gaudir dels següents avantatges:

1. Els perfils de concentració resolts contenen la informació rellevant sobre la composició dels píxels i són de dimensió menor i tenen menys soroll que els espectres originals.
2. Els perfils de concentració resolts contenen informació específica de cadascun dels components de la imatge i tenen significat químic.
3. Els perfils de concentració poden ser sotmesos a mètodes de postprocessat, com per exemple normalització, autoescalat...

A continuació es resumeix l'anàlisi del tall de càlcul renal (A) com a cas pràctic dels procediments anteriorment desenvolupats. Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, es van obtenir tres mapes de distribució i tres espectres purs en la resolució del tall de càlcul renal (A) mitjançant el mètode MCR-ALS (vegeu figura 5.1.1.1.1a). Els resultats obtinguts amb el mètode MCR-ALS van ser emprats per a dur a terme la identificació i quantificació dels constituents i la segmentació de la imatge.

La identificació dels constituents de la imatge, tal i com s'ha explicat abans, es basa en un mètode de *screening* entre una biblioteca d'espectres i els espectres resolts. En aquest treball, es va disposar d'una biblioteca d'espectres Raman dels constituents més freqüentment trobats en la formació de càlculs renals ¹⁵. A partir dels espectres purs resolts del càlcul renal (A) i la biblioteca d'espectres es van identificar fàcilment dos constituents: whewelita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i whedelita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Van ser reconeguts fàcilment perquè els espectres purs resolts venien de la imatge amb la contribució de fluorescència corregida i eren molt propers als reals. Es va dur a terme una segona resolució fixant els espectres dels dos compostos identificats (whewelita i whedelita) i es va poder identificar el tercer constituent, la dahlita (vegeu figura 4 de l'article relacionat).

Aquestes identifications són raonables si es considera la bona concordança entra la forma dels espectres resolts i dels espectres identificats. A més, està descrit que en càlculs de tipus càlcic aquests compostos apareixen sovint simultàniament ¹⁵.

A continuació es va realitzar el càlcul de la contribució del senyal individual per a cadascun dels constituents identificats sobre el senyal total a partir de l'ús dels perfils de concentració i dels espectres purs resolts. La whewelita presentava una contribució del senyal del 52,0%, la wedelita del 9.5% i la dahlita del 38,5%.

Finalment, es van emprar els perfils de concentració com a informació de partida en l'anàlisi de segmentació. Es va emprar l'algoritme K-means (vegeu apartat 4.4.1) com a mètode no supervisat per a l'anàlisi de segmentació del càlcul renal (A). El nombre de clústers es va determinar mitjançant els índexs de validesa de Davies-Bouldin i Silueta. Es va determinar un nombre total de tres clústers (A, B i C). Tot i que el nombre òptim de clústers segons els índexs de validesa de Davies-Bouldin i Silueta va ser igual a dos, es va optar per un nombre de clústers igual al nombre de constituents resolts. En la figura 5.1.1.2.4 es poden observar els resultats de segmentació, el mapa de segmentació (representació espacial de l'assignació dels píxels a les diferents classes) i els perfils dels centroides (composició mitjana dels píxels de cada classe). En el cas de l'ús de la matriu de perfils de concentracions com a informació de partida per a l'anàlisi de segmentació, els centroides es defineixen com els valors mitjans de la concentració dels components en els píxels per a cadascuna de les classes. En aquest cas els centroides són químicament interpretables ja que és possible conèixer quin constituent o mescla de constituents es troben representats en cada classe de segmentació. Els perfils dels centroides proporcionen informació de les composicions de les seves classes associades, per exemple, es pot veure que els clústers "A" i "C" són bàsicament mescles binàries de whedellita i dahlita, on la primera predomina principalment en la classe "A" i la segona en la classe "C" (vegeu els perfils dels centroides a la figura 5.1.1.2.4).

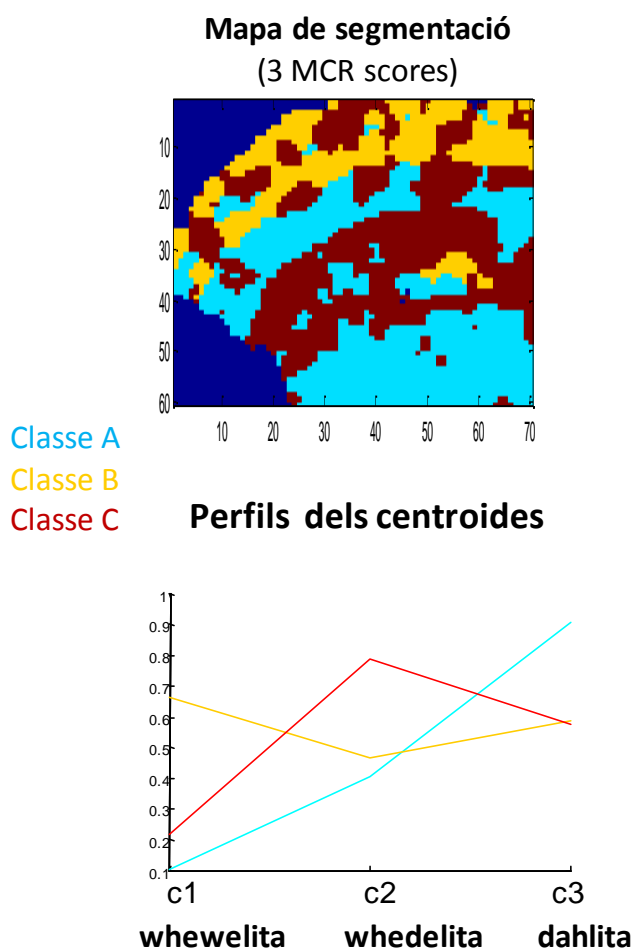


Figura 5.1.1.2.4. Mapa de segmentació i perfils dels centroides de les tres classes A, B, C de segmentació a partir de l'ús de la matriu **C** resolta mitjançant MCR-ALS

Algunes de les etapes del procés d'anàlisi seguit en el càlcul (A) poden ser omeses i d'altres poden ser incorporades, en funció de la naturalesa química de la mostra i el problema d'interès. Així doncs, en l'anàlisi del càlcul renal (B), en què un dels objectius se centra en la detecció dels components minoritaris, es va prescindir de la correcció de la línia de base (pas opcional) per tal de no eliminar senyal espectral relacionat amb informació rellevant de les espècies minoritàries. En la mateixa anàlisi, abans de dur a terme la segmentació de la imatge, els perfils de concentració de la matriu (**C**) van ser autoescalats en la direcció de les columnes, amb la finalitat d'equilibrar les diferències d'abundància total entre constituents. D'aquesta forma, la segmentació donava la mateixa importància als components majoritaris i minoritaris de la imatge

(vegeu figura 5.1.1.2.5). Els postprocessats dels resultats de resolució són etapes que s'utilitzaran o no en funció del problema en estudi.

A partir dels estudis descrits, es va definir un protocol metodològic per a la resolució individual d'imatges Raman representat en la figura 5.1.1.2.5, on es proposa l'eliminació opcional de la línia de base produïda per la contribució fluorescent mitjançant el mètode de mínims quadrats asimètrics (AsLS). A continuació es duu a terme la resolució mitjançant el mètode MCR-ALS, que descompon la matriu de dades originals en els mapes de distribució (matriu **C**) i en els espectres purs (**S^T**) dels constituents de la imatge. A partir dels espectres resolts (**S^T**) es poden identificar els diferents constituents de la imatge mitjançant la seva projecció sobre l'espai definit pels espectres de la biblioteca. En el cas d'identificacions positives, es pot dur a terme una segona resolució fixant els espectres de les espècies conegudes per a millorar la qualitat dels resultats finals. També la informació de les matrius **C** i **S^T** s'utilitza per al càlcul de la contribució del senyal de cadascun dels constituents sobre el senyal total. I, finalment la matriu (**C**) pot ser emprada com a informació de partida per a l'anàlisi de segmentació, previ preprocessat dels perfils de concentració si cal. Aquest és un esquema vàlid per a l'anàlisi individual d'una imatge hiperespectral Raman, aplicable a qualsevol tipus de mostra.

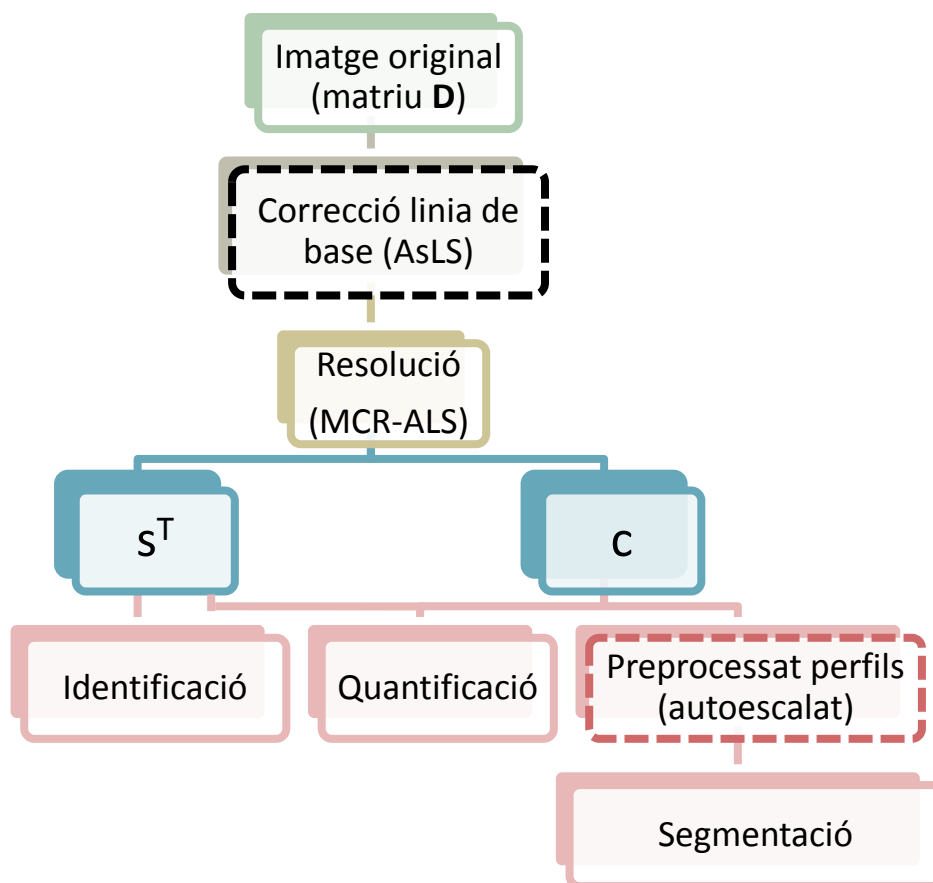


Figura 5.1.1.2.5 Protocol metodològic per a l'anàlisi individual d'una imatge Raman. Les etapes en línies discontinúes són opcionals.

5.1.2 Bibliografia

- (1) Mazet, V., Carteret, C., Brie, D., Idier, J., and Humbert, B. (2005) Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **76**, 121–133.
- (2) Leger, M. N., and Ryder, A. G. (2006) Comparison of Derivative Preprocessing and Automated Polynomial Baseline Correction Method for Classification and Quantification of Narcotics in Solid Mixtures. *Appl. Spectrosc.* **60**, 182–193.
- (3) Zhao, J., Lui, H., McLean, D. I., and Zeng, H. (2007) Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **61**, 1225–1232.
- (4) Lasch, P. (2012) Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **117**, 100–114.
- (5) Amigo, J. M. (2010) Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 93–109.
- (6) Ramos, P. M., and Ruisánchez, I. (2005) Noise and background removal in Raman spectra of ancient pigments using wavelet transform. *J. Raman Spectrosc.* **36**, 848–856.
- (7) Hu, Y., Jiang, T., Shen, A., Li, W., Wang, X., and Hu, J. (2007) A background elimination method based on wavelet transform for Raman spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **85**, 94–101.
- (8) O’Grady, A., Dennis, A. C., Denvir, D., McGarvey, J. J., and Bell, S. E. J. (2001) Quantitative Raman Spectroscopy of Highly Fluorescent Samples Using Pseudosecond Derivatives and Multivariate Analysis. *Anal. Chem.* **73**, 2058–2065.
- (9) Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G., and Sergo, V. (2008) Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophotonics* **1**, 154–69.
- (10) Eilers, P. H. C. (2004) Parametric time warping. *Anal. Chem.* **76**, 404–11.
- (11) Windig, W., and Guilment, J. (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* **63**, 1425–1432.
- (12) Juan, A. de, Maeder, M., Hanczewicz, T., Duponchel, L., and Tauler, R. (2009) Chemometric tools for image analysis’ in Infrared and Raman spectroscopy, in *Infrared and Raman Spectroscopy Imaging* (Reiner Salzer, and H. W. S., Ed.), pp 65–109. Wiley-VCH.
- (13) Tran, T. N., Wehrens, R., and Buydens, L. M. C. (2005) Clustering multispectral images: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **77**, 3–17.
- (14) Gowen, A. A., O’Donnell, C. P., Cullen, P. J., and Bell, S. E. J. (2008) Recent applications of Chemical Imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 10–22.

(15) Dao, N., and Daudon, M. (1997) Infrared and Raman spectra of calculi. Elsevier, Paris.

5.2 RESOLUCIÓ CONJUNTA DE DIVERSES IMATGES ADQUIRIDES AMB LA MATEIXA TÈCNICA ESPECTROSCÒPICA

Aquesta secció recull els articles relacionats amb l'anàlisi conjunta per MCR-ALS de diverses imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica sota diferents condicions experimentals. Es mostren els avantatges i les diferents aplicacions de l'anàlisi d'estructures multiconjunt a través dels treballs publicats. El primer article presenta resultats de l'anàlisi quantitativa i de l'estudi d'heterogeneïtat de diferents mescles de productes farmacèutics. El segon article defineix una nova estratègia per a la millora de la resolució espacial d'una imatge hiperespectral. Finalment, el tercer article revela el potencial de l'anàlisi conjunta de diverses imatges per al seguiment de la transformació polimòrfica d'un fàrmac en funció de la temperatura.

5.2.-I Sara Piqueras, James Burger, Romà Tauler, Anna de Juan. *Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution*. Chemometrics and Intelligent Laboratory System, 117 (2012) 169-182.

En aquest treball s'ha establert un procediment per a la resolució conjunta d'imatges NIR mitjançant MCR-ALS i posterior quantificació dels constituents de les mescles de principis actius i excipients. L'article mostra que a partir de l'anàlisi MCR-ALS d'un conjunt d'imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica es poden construir models de calibratge lineal per a cadascun dels constituents de la imatge. A la vegada es demostra el benefici de l'ús dels mapes de distribució resolts per a l'estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional.

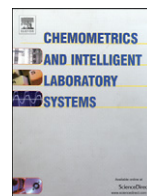
5.2.-II Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Marc Offroy, Frederic Jamme, Romà Tauler and Anna de Juan. *Chemometric Strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images. A single-cell case study*. Analytical Chemistry, 85 (2013) 6303-6311.

L'objectiu principal de l'article se centra en la millora de la resolució espacial d'una imatge d'una única cèl·lula HeLa mitjançant l'ús de la informació procedent d'un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial que recobreixen tota la superfície de la cèl·lula i que estan desplaçades lleugerament entre elles en direcció horitzontal i vertical. Un cop més es demostra el potencial del mètode MCR-ALS per a la resolució conjunta del conjunt d'imatges de baixa resolució espacial

i el posterior ús dels mapes de distribució resolts combinat amb l'algoritme de super-resolució per a l'obtenció d'un augment en la definició espacial de la imatge de la cèl·lula.

5.2.-III Sara Piqueras, Ludovic Duponchel, Romà Tauler and Anna de Juan. ***Monitoring polymorphic transformation by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis.*** Analytica Chimica Acta. 819 (2014) 15-25.

Aquest article s'orienta al seguiment de processos mitjançant l'adquisició d'imatges Raman. Concretament, s'estudia la transformació polimòrfica d'un principi actiu (carbamazepina) en funció de la temperatura mitjançant l'adquisició i anàlisi d'un conjunt d'imatges de la mostra durant el desenvolupament del procés. L'anàlisi conjunta MCR-ALS de les imatges adquirides permet la identificació dels polimorfs involucrats en el procés i permet una bona descripció de l'evolució tèrmica de les espècies a escala global i de píxel.



Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution

Sara Piqueras^{a,b}, James Burger^c, Romà Tauler^b, Anna de Juan^{a,*}

^a Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona, Spain

^b Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Barcelona, Spain

^c BurgerMetrics SIA, Latvia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2011

Received in revised form 16 December 2011

Accepted 22 December 2011

Available online 31 December 2011

Keywords:

Image resolution

NIR hyperspectral images

MCR-ALS

Global quantification

Pixel quantification

Image heterogeneity

ABSTRACT

NIR-infrared chemical imaging (NIR-CI) is a powerful technique to provide spatial and spectral information about the samples analyzed. NIR-CI presents a big potential to obtain accurate and reliable information about the quality of end products and it is also an excellent tool for process control.

Quantitative analysis and heterogeneity studies on NIR images are often carried out by multivariate calibration techniques, designed in this context as Multivariate Image Regression (MIR). Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) is another data analysis method, aimed mainly at recovering the pure spectra and distribution maps of images. This straightforward information can be potentially applied for quantitative purposes and heterogeneity description when image multiset structures are analyzed. In this work, the potential of MCR-ALS to provide quantitative and heterogeneity information has been explored paying special attention to particular aspects, such as the preprocessing used for resolution and the effect of several factors on the global quantitative results, namely: a) the design of the regions of interest (ROIs) included in the multiset image structure, b) the constraints applied in the resolution step and c) the calibration/validation strategy applied. Quantitative information at a pixel level has also been carried out to study the heterogeneity of the samples analyzed, stressing the difference between the constitutional heterogeneity (population statistics describing the quantitative distribution or pixel-to-pixel variability in concentration) and distributional heterogeneity (image maps expressing the variability in the spatial distribution of compounds in the image).

To perform the work described above, real NIR images of non-homogeneous mixtures of acetylsalicylic, caffeine and starch of different compositions have been used.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hyperspectral imaging is an active area of research that has grown quickly during the last decade. Hyperspectral images are measurements that contain spatial and spectral information and they provide chemical information and detailed knowledge of the distribution of the sample constituents in the surface (or volume) scanned. Hyperspectral imaging techniques based on Raman, infrared and fluorescence spectroscopy are useful methods in different areas, such as polymer research, materials science, biomedical diagnostic, pharmaceutical industry, analytical chemistry, process control and environmental analysis [1–5]. Hyperspectral techniques, especially NIR-infrared chemical images (NIR-CI), have opened new research trends in industrial applications, since they present an excellent capacity to obtain accurate and reliable information in all control stages of the manufacturing processes [6–9].

NIR images have the potential to provide information on the quality of the final products and on the evolution of the manufacturing process by means of the complete spectral and spatial information that they enclose. In addition, NIR imaging is a fast and non-destructive technique. These are the reasons why the use of NIR-CI has become a new useful tool in process analytical technology (PAT). To further develop NIR-CI technology in industrial analysis, it is crucial to have knowledge about the properties of the measurements and the performance of the tools designed to handle the derived data [10–12]. Pharmaceutical and other control processes often involve quantification of the compounds in a product and heterogeneity control of the final product. NIR-CI combined with chemometrics can help to resolve both issues. Quantification in hyperspectral images has often been performed by multivariate calibration methods, like Partial Least Squares (PLS) and this and related methodologies for quantification of image constituents have been known under the denomination multivariate image regression (MIR) [5,7,13–18].

Another approach for image analysis is provided by Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) which is an iterative resolution method that recovers the underlying spectroscopic

* Corresponding author. Tel.: +34 934 03 9778.

E-mail address: anna.dejuan@ub.edu (A. de Juan).

bilinear model of the image, i.e., concentration profiles (folded back into distribution maps) and pure spectra of the image constituents, by the sole use of the raw image measurement [19–22]. MCR-ALS has been proven to adapt particularly well to hyperspectral image resolution due the ease of introduction of external spectral and spatial information about the image and the ability to work with single and multiset image arrangements [5,12,23–26]. In this work, we have studied the potential of the MCR-ALS algorithm to provide heterogeneity information and quantitative information (global and at a pixel level) from NIR images. Special attention has been paid to relevant aspects linked to the image resolution and quantification by MCR-ALS, namely: a) the design of the image regions of interest (ROI) selected to build the multiset image arrangement, b) the effect of the constraints used during the resolution process, i.e., closure in the pixel direction or normalization of pure spectra and c) the calibration/validation strategy used for testing quantification performance. Use of calibration models for quantification of individual pixels and heterogeneity assessment has been addressed as well.

In this study, different non-homogenous mixtures of caffeine, acetylsalicylic acid and starch with different known mixture proportions have been prepared and imaged with an NIR image system to explore the relevant aspects related to image resolution and quantification at a global and individual pixel level.

2. Experimental (sample preparation and image acquisition)

The samples analyzed have been solid mixtures of caffeine, acetylsalicylic acid (ASA) and starch of different mixture proportions. Caffeine and ASA simulate the APIs of a pharmaceutical formulation and the starch acts as an excipient. Binary mixtures of ASA and starch or caffeine and starch and ternary mixtures of ASA, caffeine and starch in different proportions were prepared to simulate drugs of different formulation complexity. The proportions of the different compounds in the mixtures have been chosen to represent a wide composition range (see Table 1).

All substances were from Sigma Aldrich (a.r.) and were used without further purification. Preparation of the mixture samples consisted of analytically weighing of the different APIs and excipients to obtain the desired composition. The samples were put in vials and subjected to manual agitation to obtain heterogeneous mixtures.

Solid powder mixtures were deposited in plastic plates with small circular compartments of 15 mm diameter and the sample surface was flattened before image acquisition. The images have been acquired by a line-scanning NIR image acquisition system designed by BurgerMetrics. For instrument calibration purposes, full

hyperspectral calibration images of total reflectance (99% reflectance standard reference material) and instrument background signal (closed camera shutter) were first measured. These 'White' and 'Dark' standards enable non-uniform corrections due to spatial and spectral variations in illumination, optical throughput, or sensor sensitivity and also permit the transformation of sample image data from instrument counts (X) to reflectance (R):

$$R = (X - \text{Dark}) / (\text{White} - \text{Dark}) \quad (1)$$

The sample reflectance images acquired were subsequently converted to absorbance scale using the following operation:

$$A = -\log\left(\frac{1}{R}\right) \quad (2)$$

The image size is $320 \times 350 \times 216$, the first two values representing pixel dimensions in the *x* and *y* directions and the third value accounting for the number of spectral channels. The spatial pixel size is $108 \times 108 \mu\text{m}$ and the NIR spectra are the result of 16 accumulations, recorded in the spectral range 950–1660 nm.

Each formulation mixture was measured independently. For all ternary mixtures, at least one image replicate has also been recorded and some additional image replicates and sample replicates have also been measured. Sample replicates consisted of images acquired on different portions of the same sample material, whereas image replicates consisted of images acquired on the same sample portion in separate time intervals, which have required repositioning the sample in the instrument. All the images have been recorded following a random sequence, without reproducing any pattern related to the mixture composition or to the order of preparation of samples. Table 1 shows the chemical composition of the samples prepared and encodes the acquired images.

As an example of image, Fig. 1a shows the global intensity map of the ternary mixture 11 and the related NIR spectra (Fig. 1b, left plot). NIR spectra of ASA, caffeine and starch obtained as averages from images of these pure constituents are also shown (Fig. 1c).

3. Data analysis

3.1. Data preprocessing

NIR spectra contain overtone and combination bands. The recorded signal is also distorted by the scattering effects associated with differences in particle size within the sample scanned. Data preprocessing is required to facilitate the extraction of chemical information and attenuate undesirable signal contributions. Different methods (e.g. smoothing/derivatives by Savitzky–Golay [27]), Standard Normal Variate (SNV) [28], and Multiplicative Scatter Correction (MSC) are frequently used to preprocess NIR images or spectra.

Multiplicative Scatter Correction, proposed by Geladi and collaborators, corrects scattering by assuming that any NIR spectrum in an image can be described by the basic shape of a representative reference spectrum multiplied by a scattering contribution, defined as a straight line, with different slope and offset depending on the varying physical properties at each measured pixel. The spectrum of pixel *i* (*s_i*) can then be described as:

$$s_i = a_i s_{\text{ref}} + b_i \quad (3)$$

where *s_{ref}* is the reference spectrum and *a_i* and *b_i* are the slope and offset, different in each pixel, since the scattering effect is also different. The MSC-corrected spectrum is obtained as:

$$s_{\text{MSC}} = \frac{s_i - b_i}{a_i} \quad (4)$$

Table 1
Different compositions of binary and ternary mixtures of ASA, starch and caffeine.

Samples	Images recorded ^a	Sample composition		
		ASA (%)	Starch (%)	Caffeine (%)
1	D ₁	16.13	83.57	0
2	D ₂	50.01	49.99	0
3	D ₃	79.82	20.13	0
4	D ₄	84.20	15.80	0
5	D ₅	72.54	27.46	0
6	D ₆	0	83.51	16.49
7	D ₇	0	50.97	49.03
8	D ₈	0	29.87	70.13
9	D ₉	0	24.25	75.75
10	D ₁₀	0	53.25	46.75
11	D ₁₁ ; D _{11b}	16.87	19.63	63.50
12	D ₁₂ ; D _{12c} ; D _{12d} ; D _{12e} ; D _{12am} ; D _{12bm} ; D _{12cm} ; D _{12dm} ; D _{12em}	20.48	52.54	26.98
13	D ₁₃ ; D _{13b}	38.35	26.40	35.25
14	D ₁₄ ; D _{14b}	51.98	31.16	16.86

^ab, c, d, and e are image replicates obtained after different intervals of time and repositioning the sample in the instrument. Replicates with letter m are images obtained from sample replicates.

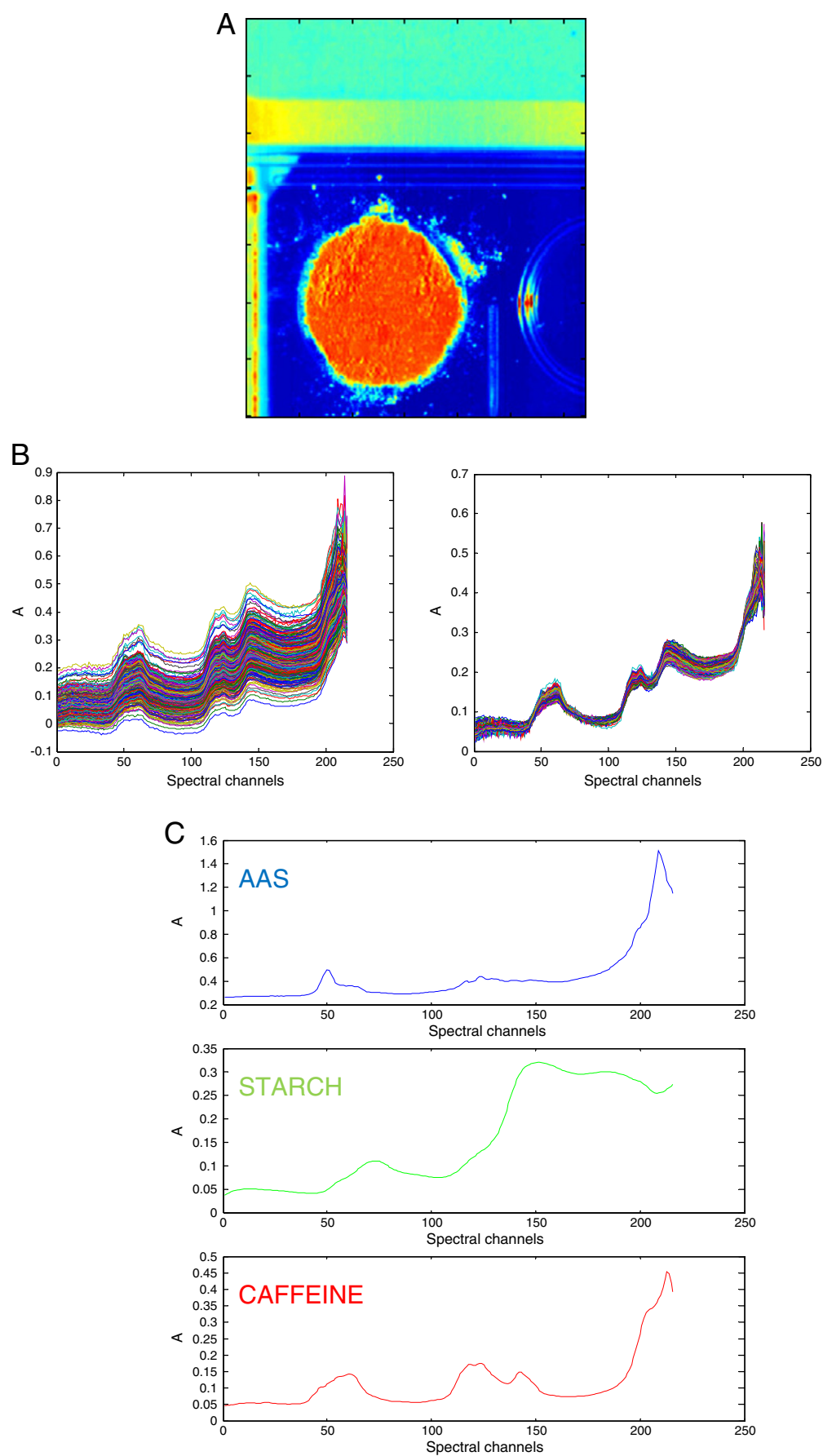


Fig. 1. a) Global intensity map of image 11. b) Raw (left) and MSC-corrected (right) NIR spectra of ternary mixture. c) NIR spectra of ASA, caffeine and starch obtained from pure images of these constituents.

The reference spectrum chosen in this work was the median spectrum of the image spectra, calculated from the medians of the spectral readings from each of the different spectral channels. The median spectrum was chosen instead of the mean spectrum to avoid the effect of outliers, e.g., dead pixels, in the definition of the reference spectrum.

MSC was applied globally to all the images analyzed in a single multiset structure, i.e., a single median reference spectrum was used to correct all images. When separate calibration and validation multisets were used, the validation set was corrected with the median spectrum obtained from the calibration set.

The MSC pretreatment was chosen among other options because, in this case, the corrected spectra by this method preserved relevant features of the original data set, such as the non-negativity of spectral readings, and this property is useful when constraints are applied in multivariate resolution methods (see Section 3.2).

3.2. Hyperspectral image resolution

The goal of hyperspectral image resolution and, consequently, of Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) is the decomposition of the original raw image (\mathbf{D}) into the distribution maps (matrix \mathbf{C}) and pure spectra of the constituents (\mathbf{S}^T) present in the image, according to the bilinear model shown in Eq. (5) [5,11,24,27]:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (5)$$

where \mathbf{D} is the raw measurement, \mathbf{C} is the matrix of concentration profiles and \mathbf{S}^T the matrix of related pure spectra. \mathbf{E} accounts for the experimental error contained in the raw measurement. In the context of image analysis, the image cube is unfolded into a matrix \mathbf{D} with rows ($x \times y$ pixels) and columns (wavelengths). The recovered \mathbf{C} matrix of stretched concentration profiles can be refolded to recover the original two-dimensional image structure (pure distribution maps) [5,12,23–26].

MCR-ALS is a resolution algorithm based on the following basic steps:

- 1) Determination of the number of constituents in the raw image (\mathbf{D}) (e.g., by SVD).
- 2) Generation of initial estimates (\mathbf{S}^T) based of the selection of the purest pixel spectra (SIMPLISMA) [25].
- 3) Given \mathbf{D} and \mathbf{S}^T , calculation of \mathbf{C} under constraints.
- 4) Given \mathbf{D} and \mathbf{C} , calculation of \mathbf{S}^T under constraints.
- 5) Reproduction of \mathbf{D} from the product of \mathbf{C} and \mathbf{S}^T . Check whether convergence is achieved, if not, go back to 3.

The alternating least-squares steps 3 and 4 involve the operations $\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ and $\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$, respectively. The end of the iterative process takes place when the reproduction of the original data \mathbf{D} by the bilinear model of the resolved concentration profiles and spectra has a sufficient quality value and there is no significant variation among the results of consecutive cycles. The parameter used to measure the fit quality of the model is:

a) Lack of fit

$$\text{lof}(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{ij} r_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (6)$$

where d_{ij} is the element of the original data matrix in row i and column j and r_{ij} is the residual obtained from the difference between the element d_{ij} of the original data and the analogous element obtained from the MCR-ALS model.

During the alternating least-squares steps, constraints are used to introduce information to model the \mathbf{C} and \mathbf{S}^T profiles in the resolution process and to decrease the ambiguity effects in the final results obtained [19,22]. In image resolution, non-negativity in the concentration and the spectral direction is the most commonly used

constraint. In our case, this constraint can also be applied because the concentration of the constituents in the image as well as the spectroscopic readings of the MSC-corrected NIR spectra is positive [19,22,29]. Normalization of pure spectra in \mathbf{S}^T is also a common constraint used to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization. An alternative way of normalization used by some authors in image resolution (or unmixing) of solid mixtures is closure, assuming that the percentage of all compounds in each pixel sums to 100% [12,30]. Often, the simultaneous analysis of several images can be of interest. In this case multiset structures or augmented data matrices \mathbf{D} are built that contain different submatrices \mathbf{D}_i , linked to different individual images. A multiset structure also obeys the bilinear model based on Beer–Lambert law (see Eq. (5)). In image analysis, the multiset structures are column-wise augmented matrices, formed by the spectra of several NIR images one under the other. Thus, the pixel spectra of all images are organized in a data table \mathbf{D} , where a block (or submatrix) belongs to a particular image. The decomposition $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$ provides a single matrix \mathbf{S}^T of pure spectra, valid for all the images analyzed, and a matrix \mathbf{C} , formed by as many submatrices as images in the data set. The profiles in each of these submatrices can be refolded conveniently to recover the related distribution maps of each image (see Fig. 2).

MCR-ALS for multiset analysis works as described before but it can accommodate an additional constraint called *correspondence among species*, which allows introducing the information related to the presence/absence of certain constituents in the different images. The information related to this constraint is encoded in a binary matrix, sized (number of images \times number of image constituents). When a compound is set to be absent, the related concentration profile is a null profile. This constraint is essential to decrease and often suppress the rotational ambiguity of the final resolution results, particularly when the composition of the images analyzed follows a proper experimental design [31]. In the context of image resolution, uniqueness would be ensured if all constituents in the image data set are absent in either a full image or in certain pixels. The global composition of images (presence/absence of compounds) can be sometimes controlled in multiset structures; when this is not the case, the huge amount of pixels in an image and the diversity of pixel compositions (particularly in heterogeneous samples) very often ensures uniqueness in the final results.

3.3. Quantification based on MCR-ALS: Calibration and validation strategies

The results of multiset image resolution analysis may be potentially used to provide quantitative information. Global quantitative information, i.e., percentage of the different constituents in an image, can be obtained by using appropriately the resolved concentration profiles (\mathbf{C} matrix). For example, relative quantification of a particular compound in the different images can be obtained by comparison of the mean values of the concentration profiles related to each particular image. When real reference values of concentration exist for some images, the mean values from the concentration profiles obtained by MCR-ALS can be regressed against these reference values to build calibration lines (see Fig. 3).

A calibration model can be built for each one of the constituents of the sample, i.e., for each one of the resolved image contributions. These models relate the quantitative information from MCR-ALS (\overline{c}_{ALS}), i.e., the mean values of the concentration profile of one constituent in the different images, to the associated real percentages of that constituent in the images (% ref).

$$\overline{c}_{ALS} = a\% \text{ref} + b \quad (7)$$

The percentage values of one constituent in an unknown image can be predicted according to the previous model as follows.

$$\% \text{pred} = \frac{\overline{c}_{ALS} - b}{a} \quad (8)$$

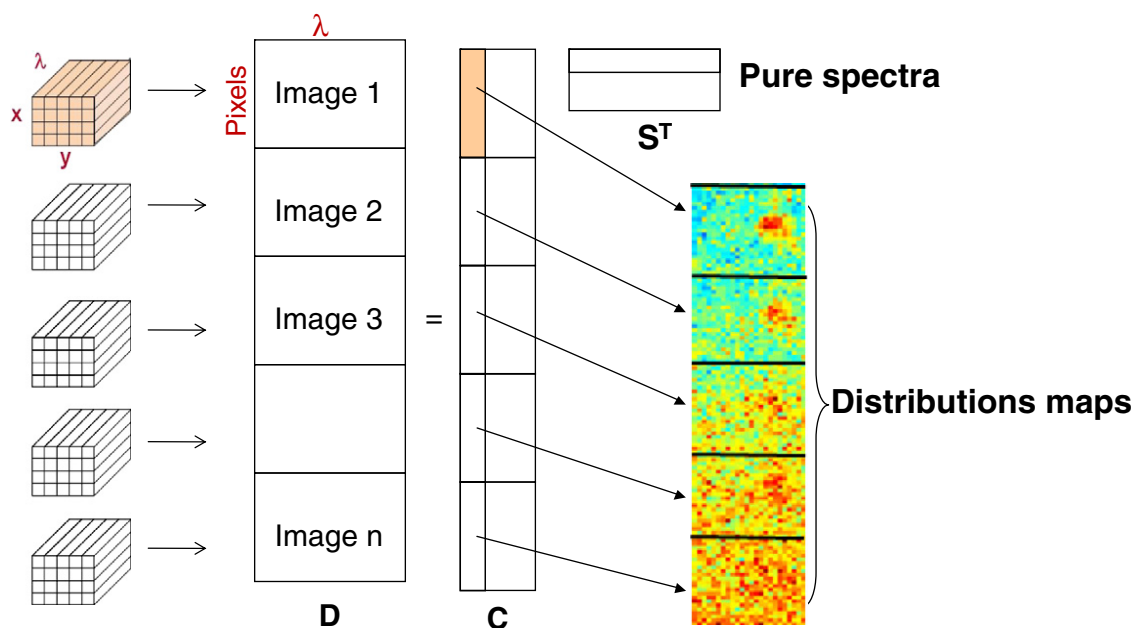


Fig. 2. Resolution process applied to an image multiset structure.

In this work, we have studied the viability of obtaining quantitative results from NIR images from MCR-ALS information. The quality of the information obtained has been assessed through the regression parameters linked to the predicted ($\hat{\%}pred$) vs. reference ($\%ref$) values and through the estimation of RMSEC for the calibration set and RMSEV for the validation set, defined as:

$$RMSEC(V) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{\%}pred_{(i)} - \%ref_{(i)})^2}{n}} \quad (9)$$

where n is the number of samples (images).

The same calibration model has been applied to perform quantification on individual pixels by taking the individual values of the concentration profiles obtained by MCR-ALS as opposed to the mean value used for global quantification. The quantification at an individual pixel level allows the study of the heterogeneity of the samples imaged.

Once the viability of using MCR-ALS information for quantification has been proven, validation of the calibration models is required. In contrast to classical multivariate calibration methods, the use of MCR-ALS to obtain quantitative information requires a previous resolution step, where the information about reference concentrations is not actively used. Only after the resolution step, the calibration model is built by relating the MCR-ALS information to the reference

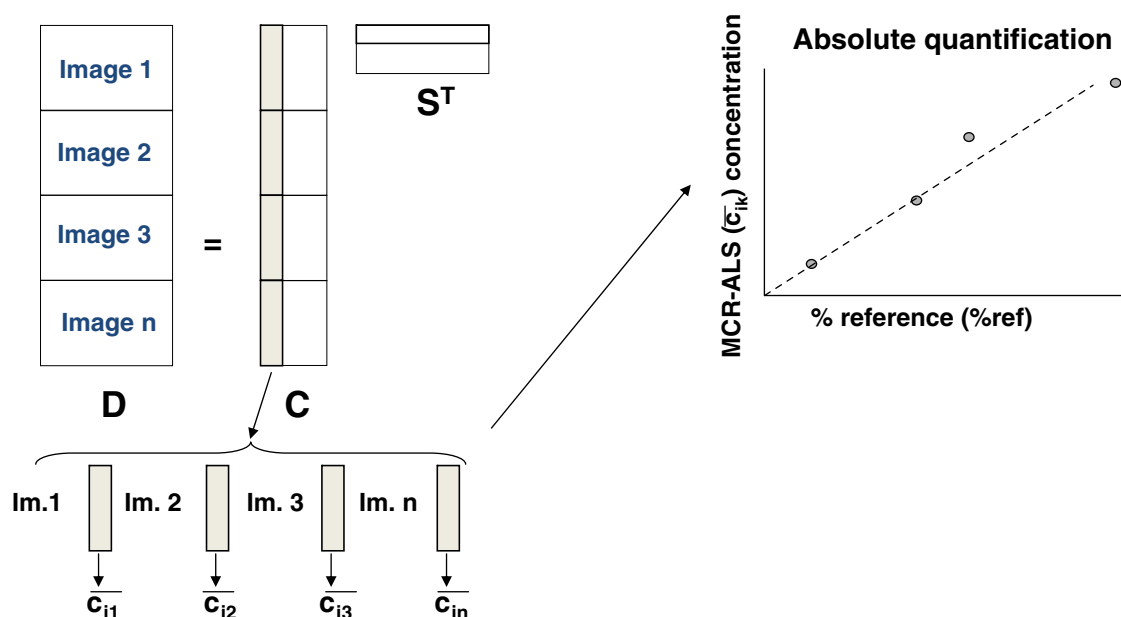


Fig. 3. Scheme followed to obtain global quantitative information of the different constituents in an image using the resolved concentration profiles (C matrix) from MCR-ALS image multiset analysis.

concentration values. Therefore, we have proposed several validation strategies (A, B and C) based on different combinations of the steps of resolution of the image multiset structure and construction of the calibration model (see Fig. 4).

Validation strategy A (in Fig. 4a) includes a single resolution step of all available images. For each image, the elements of the MCR-

ALS concentration profiles are divided in two halves: the mean value of the first half is used to build the calibration model and the mean of the other half for validation purposes. In this strategy, the construction of the calibration model is the only validated stage because the resolution analysis was common for all images used.

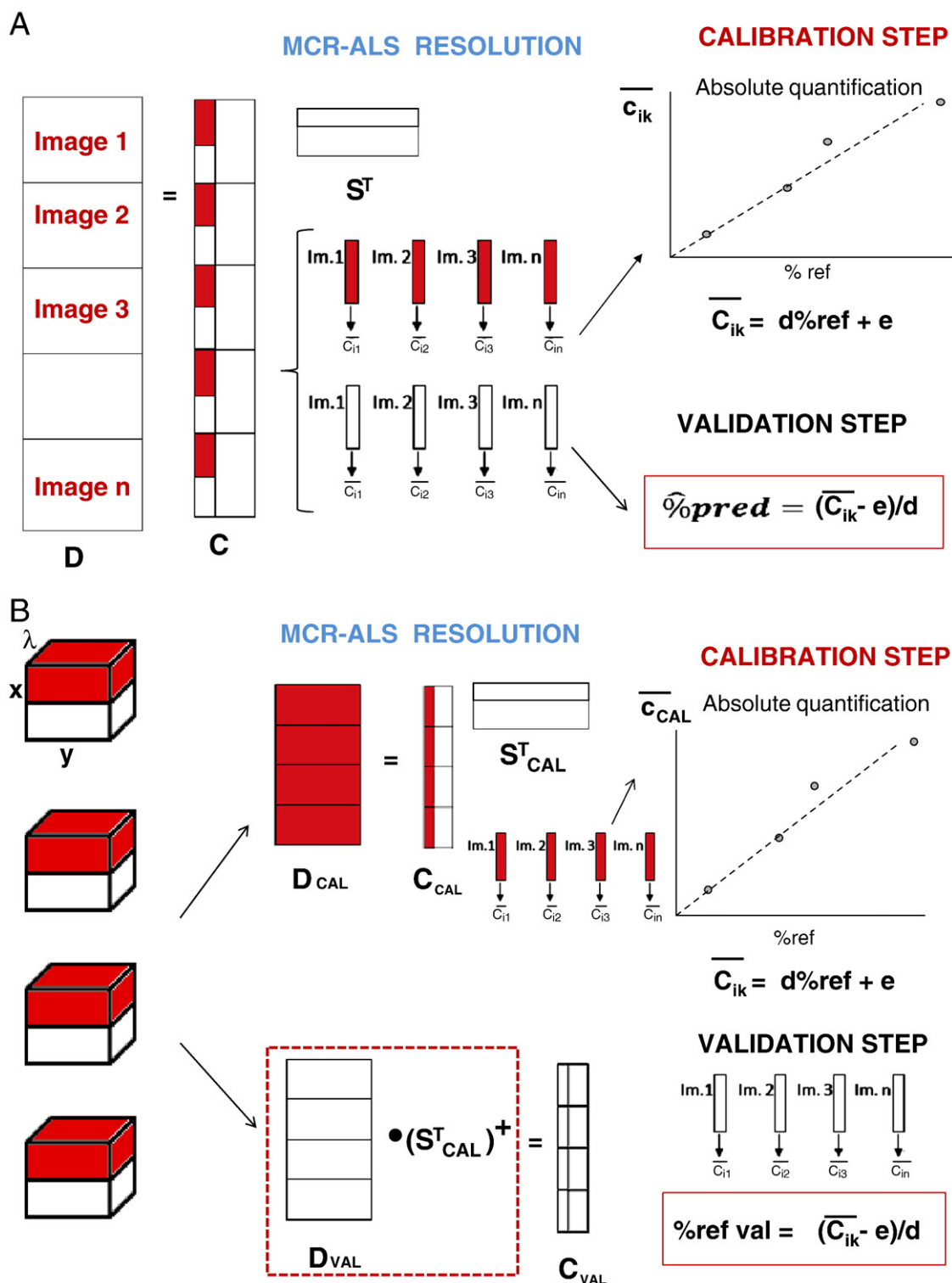


Fig. 4. Schemes of validation strategies for quantification using MCR-ALS information. a) Validation strategy A, b) validation strategy B, and c) validation strategy C.

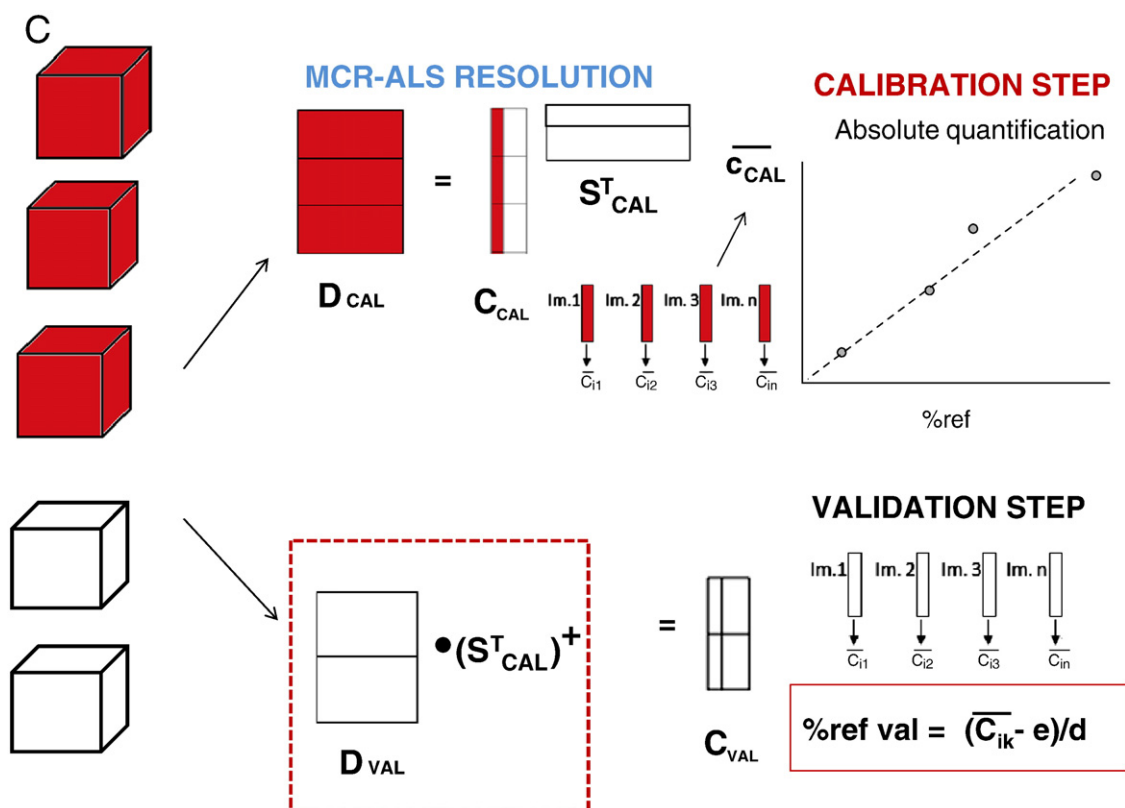


Fig. 4 (continued).

Validation strategy B (in Fig. 4b) works by dividing each available image in two halves, one used to build a multiset calibration structure (D_{cal}) and the other a multiset validation structure (D_{val}). The resolution step is only performed in the D_{cal} structure and the calibration model is derived relating the mean of concentrations profiles from MCR-ALS to the relevant reference concentration values. The validation stage, performed using the D_{val} structure, takes place through the following steps:

- Estimation of concentration profiles related to the D_{val} structure by a single non-negative least-squares step taking the MCR-ALS pure spectra obtained in the calibration stage (S_{cal}^T).

$$C_{val} = D_{val} S_{cal} (S_{cal}^T S_{cal})^{-1} \quad (10)$$

- Prediction of each image constituent percentage from the mean values of the estimated concentration profiles, C_{val} .
- Computation of RMSEV values.

With this strategy, both the resolution results, used for the calculation of C_{val} , and the construction of the calibration model are validated.

Validation strategy C (in Fig. 4c) is similar to strategy B, since both methods validate the resolution and the construction of the calibration model, but the images used in the calibration stage are independent from the images used in the validation stage. Therefore, two multiset structures containing different full images for calibration (D_{cal}) and validation purposes (D_{val}) are built. MCR-ALS is applied to D_{cal} and the results are afterwards used to build the calibration model and the validation step as in strategy B. It is worth highlighting that, in this case, MSC correction of validation images must be carried out taking as a reference the median spectrum of the calibration image set.

4. Results and discussion

4.1. Resolution of image multiset structures. Effect of ROIs selected

We have carried out the analysis for the following set of 19 images, structured as a column-wise augmented matrix, since the spectral direction is common to all images.

$$[D_1; D_2; D_4; D_6; D_7; D_9; D_{11}; D_{11b}; D_{12}; D_{12am}; D_{12bm}; D_{12em}; D_{12b}; D_{12c}; D_{12e}; D_{13}; D_{13b}; D_{14}; D_{14b}]$$

The multiset structure analyzed was formed by images of binary mixtures of caffeine and starch and binary mixtures of ASA and starch (one image per sample) and examples of all ternary mixtures including image replicates and sample replicates (one image and an image replicate per sample and additional image replicates and sample replicates for sample 12). See Table 1 for sample composition and image codes.

Due to the huge dimensions that a column-wise augmented data would have if all full images were used, working with a representative area of each image has been preferred. To see the effect of the location and shape of selected regions of interest (ROI) in the image on the resolution results, resolution analysis has been performed on three different multiset structures, each containing 2500 pixels per image region: one structure contained square ROIs of 50×50 pixels taken in the center of each image, another with rectangular ROIs of 119×21 pixels and a third formed by 2500 pixels, selected randomly within the full area of the image. Fig. 5 shows how these regions are defined in a particular image. This study aims at seeing whether the resolution results, i.e., model fit and profiles recovered, may be significantly affected by the different geometry and, eventually, the different illumination received by the different ROIs.

Before resolution analysis, preprocessing of the NIR image spectra was necessary. As mentioned in Section 3.1, Multiplicative Scatter

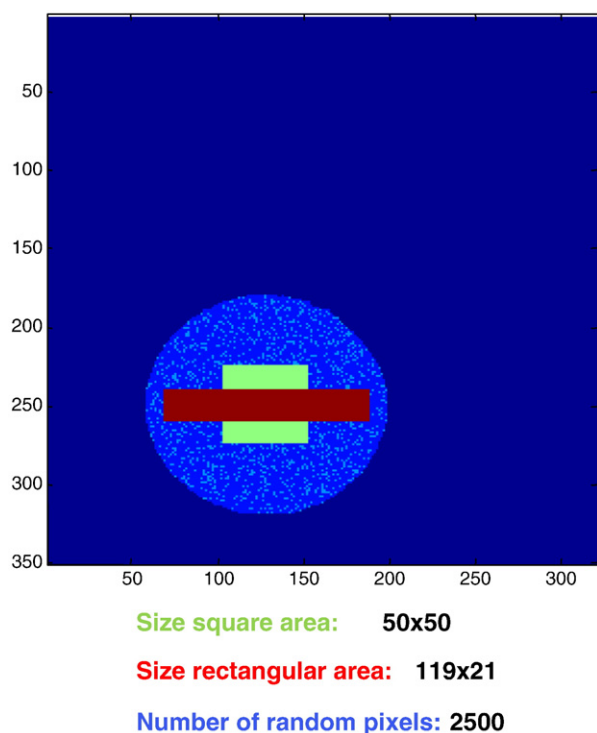


Fig. 5. Design of the selected regions of interest (ROI) within each image used to build the image multiset structures formed by square regions, rectangular regions and random pixel selection.

Correction (MSC) was the pretreatment chosen since it preserved the non-negativity of the NIR spectra, a useful feature for resolution purposes. Fig. 1b (right plot) shows the MSC-corrected spectra for the multiset structure formed by square regions.

MCR-ALS was applied to the multiset structures containing the MSC-corrected spectra. Initial estimates of pure spectra were obtained by SIMPLISMA using an image subset, representative of the different sample compositions. The constraints applied in the resolution analysis were non-negativity in the concentration profiles and spectra and normalization of spectra (using 2-norm, i.e. the Euclidean norm). The *correspondence among species* constraint was used since the global composition of the image, i.e., the presence/absence of constituents in each sample was known. From this information, a binary matrix with 19 blocks, (representing the 19 images analyzed simultaneously) and 3 columns (representing the number of constituents: ASA, caffeine and starch) coding the presence (1) or absence (0) of each constituent in each image was introduced as active information in the resolution process. The absent constituents present in the image were then forced to have null concentration profiles.

	ASA	CAFF	STARCH
Binary samples ASA/starch	1	0	1
Binary samples caffeine/starch	0	1	1
Ternary samples ASA/caffeine/starch	1	1	1

Fig. 6 shows the resolution results of the multiset structure formed by square image ROIs. The distribution maps of each image are displayed in Fig. 6a and the related pure spectra in Fig. 6b. The lack of fit is 3.2%, which is satisfactory for NIR image measurements. The resolved spectra in Fig. 6b are very similar to the pure spectra of the constituents, shown in Fig. 1c. Dark blue distribution maps refer to absent constituents in images of binary mixtures and the rest of the maps use a gradual color scale, where the blue color refers to small concentration values and the red color to large values. The color

evolution in the distribution maps matches the relative concentration of the different constituents in the images. The degree of spatial heterogeneity of each constituent can be qualitatively seen in the distribution maps. The similarity found in the distributions maps of image replicates (11 and 11b, 13 and 13b, 14 and 14b, 12b, 12c and 12e, and 12am, 12bm and 12em) indicates good measurement reproducibility. The very small differences among them can be attributed to the manual repositioning of the sample in the instrument. Subtle differences in distribution maps among the sample replicates (e.g., between maps 12b, c e and maps 12bm, cm and em) are due to the natural heterogeneity of the analyzed mixtures.

The results of resolution of multiset structures obtained from square regions, rectangular regions and randomly selected pixels have not presented significant differences in the quality parameters of resolution. Pure solved spectra were recovered correctly and the lack of fit was 3.2% for square regions, 3.21% for rectangular regions and 3.62% for the random selection of pixels. These results confirm that there are no significant effects in the spatial profiles recovered linked to the design of the ROIs selected.

When resolution is the only goal of the analysis (understood as the recovery of pure spectra and distribution maps) structured regions of consecutive neighborhood pixels are the obvious choice to preserve the spatial information of the image. However, the random selection of pixels was used because of the quantification study presented in the next sections.

4.2. Global quantification

4.2.1. Effect of the ROI selected

Although no effect of the ROI selected was observed in the qualitative information from the resolution analysis, i.e., in the profiles recovered, the potential effect on the global quantification of the constituents in the image has to be explored. Global quantification, as explained in Section 3.3, was carried out using the resolution results from the multiset structures formed by square regions, rectangular regions and selection of random pixels, presented in the previous section.

Table 2 collects the main results related to the quantification of the three constituents in the images contrasting the different kinds of ROIs selected.

The regression lines that relate predicted values to reference values show high correlation coefficients and slope and offset values close to 1 and 0, respectively. Therefore, there was a good relationship among the quantitative information obtained from MCR-ALS and the real reference values and no presence of systematic error in the prediction was detected. The value of RMSEC ranged between 5.9 and 7.8%, a satisfactory interval taking into account the nature of the measurement and the heterogeneity of the samples analyzed. All these facts demonstrate the viability of using MCR-ALS results to obtain quantitative information about hyperspectral images.

Furthermore, the results have not presented any significant effect linked to the different regions of interest (ROI) selected, since RMSEC values and regression parameters were very similar among them for all three constituents in the image. Since the design of the different regions of interest selected has not introduced any significant change on the quantitative results obtained, we have ruled out the use of a random pixel selection in later studies. Although this selection mode represents a larger area of the image and thereby potentially spans a greater amount of image variance, pixels are not consecutive and, therefore, the concentration profiles cannot be refolded into distribution maps. Consequently the image based information about distributional heterogeneity of the sample is lost.

Quantitative analysis from information of MCR-ALS concentration profiles has been proven to be a good option to estimate the real concentration of the constituents in hyperspectral images. The use of structured regions of the image (square or rectangular) is preferable

for the heterogeneity study of the samples because distribution maps are recovered and the spatial structure of the image is preserved.

4.2.2. Effect of the constraints used in resolution for quantification

MCR-ALS results depend on the constraints applied during the analysis. In the context of image analysis, closure is a constraint often used in the concentration direction with the assumption that the percentages of the different constituents in each pixel

amount to 100% and that the concentration values obtained in the resolution analysis can be interpreted in a straightforward way as real pixel concentrations [32]. Closure in the resolution analysis is a different kind of normalization (applied to the **C** matrix) and it should never be applied together with the constraint of normalization of spectra (applied to the **S^T** matrix, as shown in Section 4.1).

To assess the effect of the closure constraint on the profiles recovered and on the quantitative information obtained, a new resolution

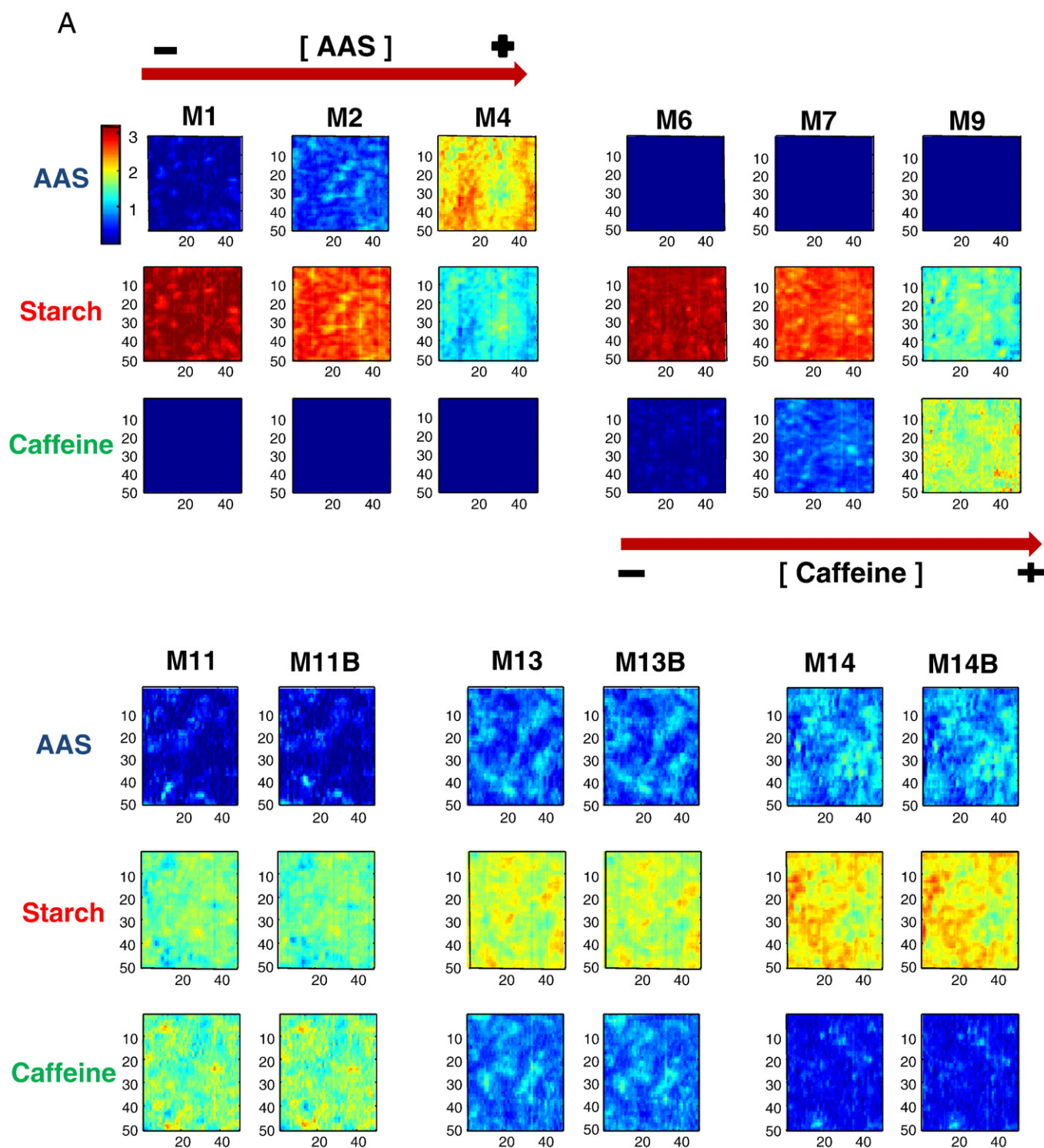


Fig. 6. Resolution results of the multiset structure formed by image square ROIs. a) Distributions maps of ASA, starch and caffeine. b) Pure resolved spectra of ASA (blue), starch (green) and caffeine (red).

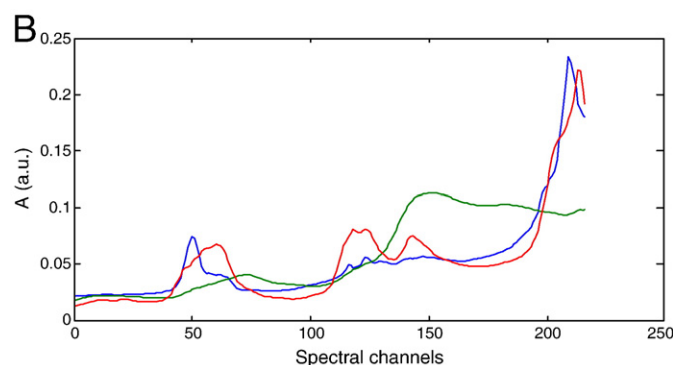
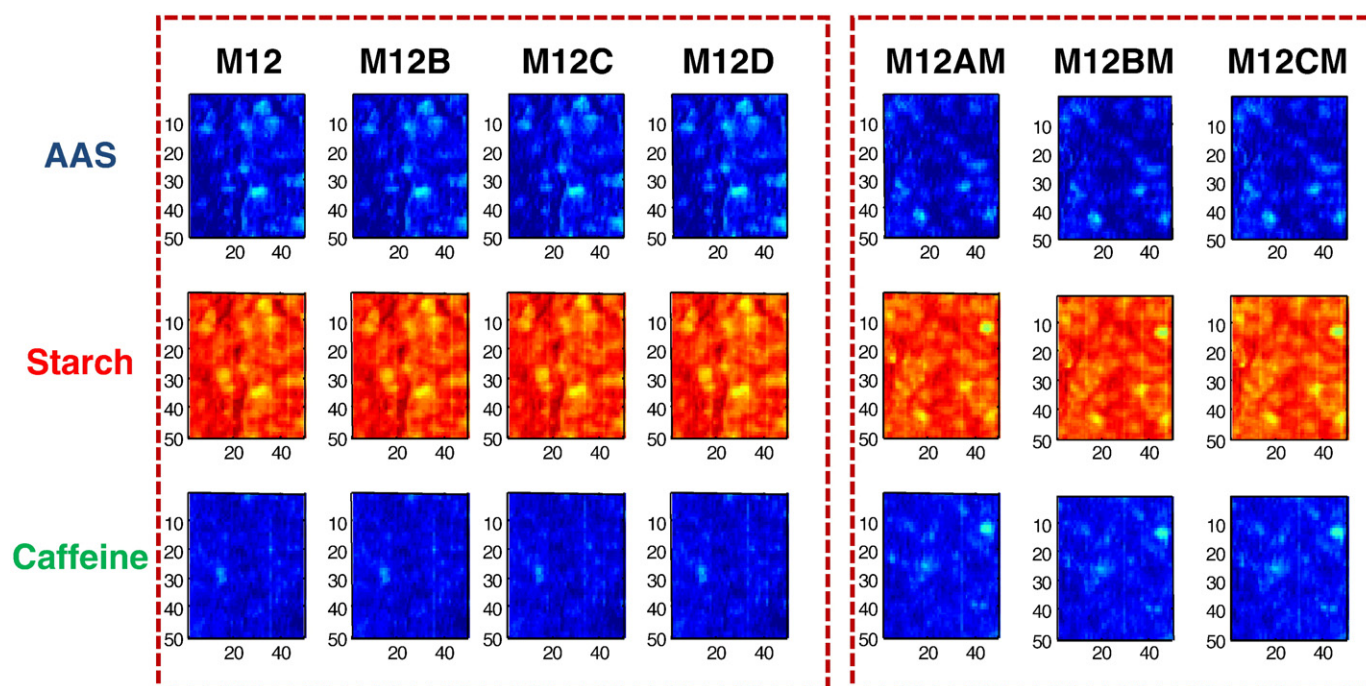


Fig. 6 (continued).

analysis of the multiset structure formed by image square ROIs was performed. This analysis was carried out using the same initial estimates and constraints mentioned in Section 4.1, but replacing the normalization of spectra by the use of the closure constraint in the

Table 2

Quality parameters of linear regression between predicted percentage vs. reference percentage. (a, slope; b, offset; r, correlation coefficient; and prediction error (RMSEC) associated with quantitative analysis of ASA, caffeine and starch of differently designed regions of interest in image.

ROI design	Constituent	a	b	r	RMSEC
Square	ASA	1.00 (7)(*)	0 (2)(*)	0.957	6.6
	Caffeine	1.00 (8)	0 (3)	0.940	7.8
	Starch	1.00 (7)	0 (3)	0.960	5.9
Rectangular	ASA	1.00 (7)	0 (2)	0.959	6.4
	Caffeine	1.00 (8)	0 (3)	0.940	7.8
	Starch	1.00 (7)	0 (3)	0.957	6.1
Pixel random selection	ASA	1.00 (6)	0 (2)	0.957	6.2
	Caffeine	1.00 (7)	0 (3)	0.954	6.8
	Starch	1.00 (7)	0 (3)	0.960	5.9

(*) Values in parentheses indicate the error associated with the last significant figure.

concentration direction. The closure constraint was implemented in a least-squares sense and not forcing the sum of concentrations to equal exactly a predefined value [33,34]. The lack of fit of this analysis was 3.01 and the shape of the resolved spectra and the distribution maps were very similar to those in Fig. 6, where normalization of spectra was applied instead (not shown for brevity). Therefore, the quality of the resolution analysis is comparable.

Table 3 shows the mean value of the MCR-ALS concentration profile for each constituent in each image and how it compares with the related real concentration.

Significant bias can be observed in the values obtained for each of the constituents, where ASA and caffeine are underestimated and starch is overestimated. The lack of clear knowledge about the unit spectral intensity of the compounds studied and the slight residual ambiguity in the final results suggests a warning about generalizing a straight association between MCR-ALS concentrations (obtained under closure) and real values.

However, the quality of the resolution results (recovered profiles and model fit) performed using closure normalization is as good as that obtained with spectra normalization. Therefore, if quantification is obtained by regressing the MCR-ALS concentration information against the real reference values, good quantitative results are obtained (see Table 4), independently on the normalization procedure (either spectra normalization or closure) used in the resolution analysis.

Table 3

Comparison of real concentration values and MCR-ALS mean concentration values obtained by multiset image resolution using closure constraint.

Image	Real conc. (% ref.)			MCR-ALS conc (% pred)			% pred–% ref		
	ASA	CAFF	STARCH	ASA	CAFF	STARCH	ASA	CAFF	STARCH
D₁	16.3	0	83.57	2.56	0	97.44	–13.74	0	13.87
D₂	50.01	0	49.99	23.09	0	76.88	–26.92	0	26.89
D₄	84.2	0	15.8	81.60	0	18.34	–2.6	0	2.54
D₆	0	16.49	83.51	0	1.20	98.75	0	–15.29	15.24
D₇	0	49.03	50.97	0	24.38	75.60	0	–24.65	24.63
D₉	0	75.75	24.25	0	81.22	18.41	0	5.47	–5.84
D₁₁	16.87	63.5	19.63	8.74	65.01	26.25	–8.13	1.51	6.62
D_{11b}	16.87	63.5	19.63	9.24	66.34	24.42	–7.63	2.84	4.79
D₁₂	20.48	26.98	52.54	10.43	13.43	76.13	–10.05	–13.55	23.59
D_{12am}	20.48	26.98	52.54	11.87	9.63	78.50	–8.61	–17.35	25.96
D_{12bm}	20.48	26.98	52.54	12.57	9.22	78.21	–7.91	–17.76	25.67
D_{12em}	20.48	26.98	52.54	13.18	9.97	76.84	–7.3	–17.01	24.3
D_{12b}	20.48	26.98	52.54	10.39	13.25	76.36	–10.09	–13.73	23.82
D_{12c}	20.48	26.98	52.54	9.86	13.65	76.49	–10.62	–13.33	23.95
D_{12e}	20.48	26.98	52.54	11.50	14.24	74.26	–8.98	–12.74	21.72
D₁₃	38.35	35.25	26.4	27.07	31.16	41.76	–11.28	–4.09	15.36
D_{13b}	38.35	35.25	26.4	28.14	31.28	40.59	–10.21	–3.97	14.19
D₁₄	51.98	16.86	31.16	35.28	14.58	50.14	–16.7	–2.28	18.98
D_{14b}	51.98	16.86	31.16	35.44	14.56	50.00	–16.54	–2.3	18.84
Global bias ^a							–11.08	–9.26	17.11

^a Evaluated for each constituent as, $\sum_i \left(\frac{\%pred_i - \%ref_i}{n} \right)$ where i refers to the image number and n to the total number of images.

4.2.3. Effect of calibration/validation strategy

The conclusions discussed in Sections 4.2.1 and 4.2.2 suggest that regressing the MCR-ALS quantitative information against the reference values yields reasonable RMSEC values. To test the predictive ability for unknown images, the models need to be validated with independent test data. Different model validation strategies proposed in Section 3.3, were summarized as follows: validation strategy A proceeds with a single validation step and strictly validates the construction of the calibration model between MCR-ALS and reference values, strategy B validates the resolution and calibration steps using different portions of each image as calibration and validation set, and strategy C validates resolution and calibration, but uses different images in the calibration and validation set.

Strategy A was applied to the same multiset structure formed by image square ROIs used in Sections 4.2.1. and 4.2.2. Strategy B was based on this same multiset, but first split 50:50 image pixels between calibration and validation sets. Strategy C used two different sets of calibration and validation images. **D_{cal}** was formed by images from binary and ternary mixtures:

$$[D_1; D_2; D_4; D_6; D_7; D_9; D_{11}; D_{12}; D_{13}; D_{14}; D_{12b}; D_{12c}; D_{12am}; D_{12bm}; D_{12cm}]$$

and **D_{val}** was formed by images from binary and ternary mixtures not used in the calibration step [**D₃**; **D₅**; **D₈**; **D₁₀**; **D_{11b}**; **D_{12d}**; **D_{12e}**; **D_{12dm}**; **D_{12em}**; **D_{13b}**; **D_{14b}**].

Table 5 shows the results of the different validation strategies on the calibration and validation stages for each constituent using the suitable multiset structures formed by image square ROIs.

Table 4

Quality parameters of linear regression between predicted percentage vs. reference percentage (a, slope; b, offset; r, correlation coefficient;) and prediction error (RMSEC) after regressing MCR-ALS concentration values vs. reference values associated with the multiset image resolution applying closure constraint.

	A	b	r	RMSEC
ASA	1.00 (7)(^a)	0 (3)(^a)	0.954	6.9
Caffeine	1.00 (9)	0 (3)	0.931	8.5
Starch	1.00 (7)	0 (4)	0.954	6.4

(^a) Values in parentheses indicate the error associated with the last significant figure.

All results in Table 5 are similar in quality. Regression parameters from the predicted vs. reference % values are good for the different validation strategies and, within each strategy, comparable in the calibration and validation stages. RMSEC and RMSEV are within an error range of 2.1–8.4%.

The possibility of using the information of the MCR-ALS concentration profiles for quantitative analysis is confirmed by validation method A, where the construction of the calibration model is the only validated step. Strategies B and C validated both the calibration and resolution steps, without showing a significant worsening in

Table 5

Quality parameters of linear regression between predicted percentage vs. reference percentage (a, slope; b, offset; r, correlation coefficient;) and prediction error (RMSEC(V)) associated with quantitative analysis of ASA, caffeine and starch by means of different validation strategies in multiset image analysis of square regions.

Method	Constituent	Step	a	b	r	RMSEC(V)
Validation A	ASA	CAL	1.00 (7)(^a)	0 (2)(^a)	0.950	7.2
		VAL	1.01 (7)	0 (2)	0.960	6.4
	Caffeine	CAL	1.00 (8)	0 (3)	0.943	7.7
		VAL	0.99 (8)	0 (3)	0.947	7.4
	Starch	CAL	1.00 (7)	0 (4)	0.953	6.5
		VAL	0.95 (7)	0 (3)	0.966	5.1
Validation B	ASA	CAL	1.00 (8)	0 (3)	0.945	7.5
		VAL	1.00 (9)	1 (2)	0.958	6.5
	Caffeine	CAL	1.01 (9)	0 (3)	0.937	8.1
		VAL	0.99 (8)	0 (3)	0.943	7.8
	Starch	CAL	1.00 (7)	0 (4)	0.953	6.5
		VAL	0.95 (6)	0 (3)	0.967	5.1
Validation C	ASA	CAL	1.00 (8)	0 (3)	0.954	7.4
		VAL	0.97 (7)	0 (2)	0.991	3.6
	Caffeine	CAL	1.0 (1)	0 (4)	0.937	8.4
		VAL	0.91 (1)	0 (4)	0.935	8.4
	Starch	CAL	1.00 (8)	2 (2)	0.952	6.8
		VAL	1.18 (4)	2 (2)	0.993	2.1

(^a) Values in parentheses indicate the error associated with the last significant figure.

the validation results when explicit resolution is skipped on the image data set used for validation and replaced by a single least-squares step using the resolution model (S^T_{cal}) to obtain the concentration profiles in the validation set (c_{val}).

It is relevant to remind that strategy C performs validation using an external set of images. This fact is extremely important, since image resolution, which is the slowest step in the process, is performed only one time on the set of calibration samples. Model validation and later prediction of concentrations in unknown images would be very fast, since only a single least-squares step would be necessary to obtain the concentration profiles of the external images. Since the use of different images for calibration and validation purposes does not seem to worsen the quality parameters of the quantitative analysis, strategy C seems the most practical in a real context, where fast analysis and/or on-line control might be required.

Such an approach, as with any other calibration method, would require the verification that the set of calibration images is sufficiently large and representative of any new image that could be encountered in practice. Maintenance and updating of the calibration model (both spectral resolution and construction of calibration regression line) should be addressed to ensure good quality results.

4.3. Quantification at individual pixel level: Image heterogeneity

The advantage of using hyperspectral images is that the qualitative and quantitative information obtained goes beyond the conventional global level of interpretation to reach the local and spatial description of the sample at a pixel level.

As mentioned in Section 3.3, the calibration model obtained to perform global image quantification can be applied to perform quantification on individual pixels by taking the individual values of the concentration profiles obtained by MCR-ALS as opposed to the mean value used for global quantification. Once the concentration of all pixels in an image is determined, information about the heterogeneity of the analyzed sample can be obtained. Heterogeneity works at two different levels: on the one hand, dispersion of pixel concentration values can be estimated and histogram plots can be used that show the real distribution of concentration values around the mean. Adopting nomenclature from the theory of sampling (TOS) [33,34] this could be considered the *constitutional heterogeneity* of the sample (image), since the concentration values at the smallest possible level (pixel) are considered independently from each other. However, the

spatial structure of the image is lost in this definition. The *distributional heterogeneity*, which would take into consideration how pixel concentration values relate to values in their spatial neighborhood, would be qualitatively seen by plotting the image distribution maps. Both approaches need to be considered if an integral description of sample heterogeneity is sought.

Table 6 shows information related to the *constitutional heterogeneity* of the different samples (image) by showing global parameters, such as the mean concentration value and its bias and the standard deviation, obtained from all the pixel concentration values in each image.

Different trends can be seen in the results of Table 6. Related to the constitutional heterogeneity, mostly represented by the standard deviation values, ASA presents larger values and, therefore, has more heterogeneity than starch and caffeine, which show similar values in the mixtures analyzed. In terms of accuracy, measured by the bias, all constituents show a global bias (taking into consideration all images) close to zero, which means that the accuracy in the estimation of concentration values at a pixel level is satisfactory.

A good picture of the *distributional heterogeneity* of each image would be obtained by showing the distribution maps of their constituents (they would have the same aspect as those coming directly from the MCR-ALS results, but will be affected by a scaling factor representing the conversion from arbitrary MCR-ALS concentration units to real concentration values). Therefore, the distribution maps of Fig. 6 give a clear idea of the heterogeneity of the multiset structure analyzed.

It is important to note that constitutional and distributional heterogeneity represent different concepts and similar values of standard deviation in concentration values of different constituents do not ensure a similar evenness in the spatial distributions. To illustrate this fact, Fig. 7 shows the distribution maps and related histograms of the constituents in mixture 14b. Looking at the histograms, ASA presents a larger dispersion or standard deviation than starch and caffeine, which have similar dispersions. In the case of ASA, a larger constitutional heterogeneity matches the uneven spatial distribution map of the component. However, the similar constitutional heterogeneities of starch and caffeine represent both situations of large distributional heterogeneity (the patchy pattern of starch) and a more uniformly distributed heterogeneity (see caffeine distribution map).

The homogeneity of the sample is an essential feature in industrial contexts to ensure the quality of the final product. Ongoing work by the authors aims at joining the distributional and constitutional

Table 6

Mean, absolute error and standard deviation of concentration for each constituent in each image, obtained from individual pixel values.

Image	Mean (ASA)	Mean (starch)	Mean (caff)	Bias (ASA)	Bias (starch)	Bias (caff)	Std (ASA)	Std (starch)	Std (caff)
D ₁	10.83	74.02	7.06	−5.3	−9.55	7.06	5.49	4.15	–
D ₂	34.62	55.25	7.06	−15.39	5.26	7.06	8.38	6.07	–
D ₄	101.44	5.79	7.06	17.24	−10.01	7.06	10.10	6.75	–
D ₆	6.17	73.26	9.68	6.17	−10.25	−6.81	–	2.96	2.89
D ₇	6.17	55.85	33.24	6.17	4.88	−15.79	–	4.59	5.62
D ₉	6.17	14.14	80.45	6.17	−10.11	4.7	–	7.24	7.88
D ₁₁	16.28	17.58	72.16	−0.59	−2.05	8.66	10.04	6.15	8.95
D _{11b}	16.86	16.12	73.44	−0.01	−3.51	9.94	10.18	6.08	9.25
D ₁₂	18.63	55.97	22.39	−1.85	3.43	−4.59	9.12	6.37	6.39
D _{12am}	20.32	57.71	18.68	−0.16	5.17	−8.3	10.70	7.15	5.18
D _{12bm}	21.14	57.43	18.27	0.66	4.89	−8.71	10.96	7.21	5.24
D _{12em}	21.84	56.33	19.00	1.36	3.79	−7.98	11.45	7.48	5.49
D _{12b}	18.58	56.14	22.22	−1.9	3.6	−4.76	9.03	6.40	6.33
D _{12c}	17.96	56.28	22.61	−2.52	3.74	−4.37	9.08	6.44	6.32
D _{12e}	19.86	54.45	23.14	−0.62	1.91	−3.84	9.46	6.56	6.56
D ₁₃	37.70	28.31	39.25	−0.65	1.91	4	10.96	5.50	7.62
D _{13b}	38.93	27.33	39.34	0.58	0.93	4.09	10.18	5.40	7.69
D ₁₄	47.29	34.20	23.16	−4.69	3.04	6.3	11.50	6.90	6.34
D _{14b}	47.48	34.08	23.14	−4.5	2.92	6.28	11.56	7.01	6.42
Global ^a				0.009	−0.0005	0	9.99	6.23	6.68

^a Evaluated for each constituent as, $bias = \sum_i \left(\frac{\%pred_i - \%ref_i}{n} \right)$ and $S_{global} = \sqrt{\frac{\sum_i S_i^2}{n}}$ where i refers to the number of images.

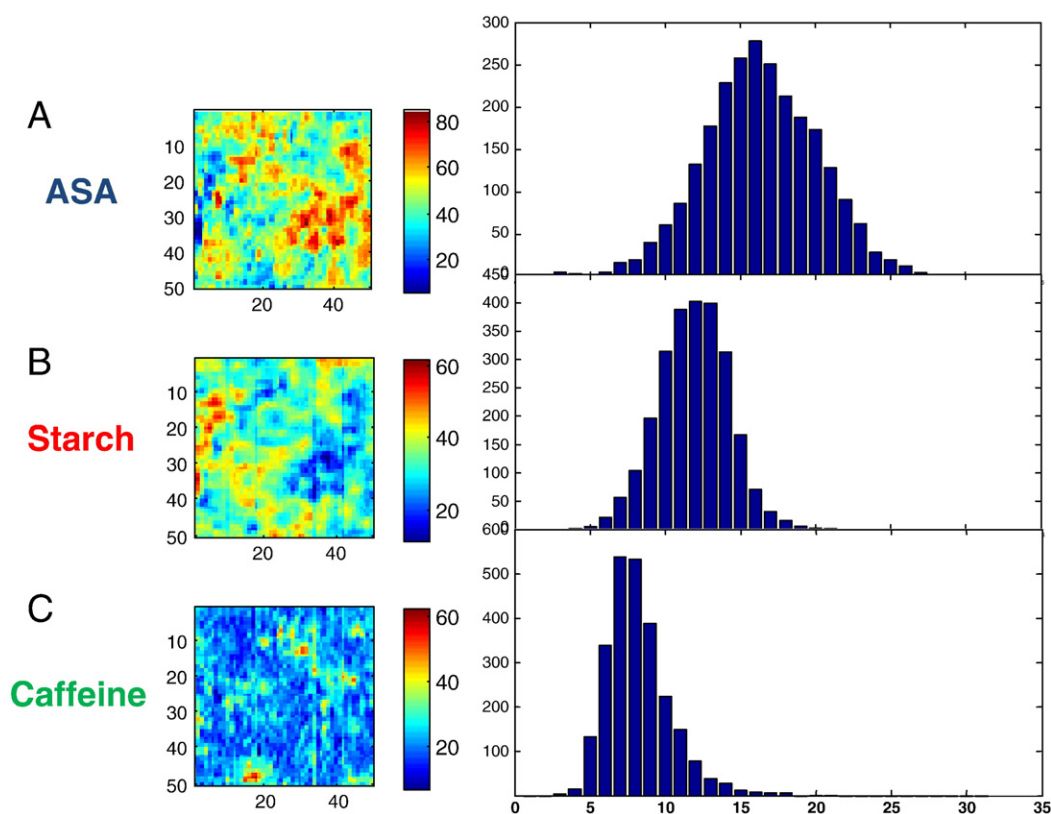


Fig. 7. MCR-ALS quantification results on individual pixels of image 14. Distribution map and histogram of a) ASA, b) starch and c) caffeine.

heterogeneity concept in a quantitative way by the design of heterogeneity curves, which may represent the variation of the heterogeneity taking into account the pixel neighborhood considered.

5. Conclusions

MCR-ALS has been proven to be an efficient method for hyper-spectral image spectral resolution as well as providing input information for quantification purposes. Quantitative analysis (both at a global and at a pixel level) starts by the resolution of an image multi-set structure followed by the use of information in the concentration profiles to build univariate calibration models for global or local quantification.

No significant effect in global image quantification has been found related to the design of the regions of interest (ROIs) used in the analysis, nor to the normalization used in the resolution process (pure spectra normalization or closure in the concentration direction), as long as the MCR-ALS relative quantitative information is regressed against real reference values to build the calibration models. Validation of the quantitative analysis (including the steps of resolution and construction of calibration lines) has shown that prediction of independent images can be carried out replacing the resolution analysis by a single least-squares step performed using the pure spectra recovered from the calibration set. This procedure results in a decrease of computation time and ensures that the quality of the quantitative information is retained.

Quantitative analysis at a pixel level has allowed the study of the constitutional and distributional aspects of heterogeneity and has shown that both aspects are needed for a good characterization of the sample. Future works will aim at finding a single approach that may quantitatively define heterogeneity taking into account these two complementary concepts.

Acknowledgements

We acknowledge funding from the Spanish government (grant CTQ2009-11572 and PhD grant for S. Piqueras). The authors of this work belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2009 SGR 45). We also acknowledge Specim (Oulu, Finland) for their contribution with the support of imaging hardware.

References

- [1] P. Geladi, H. Grahn, *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis*, Wiley, Chichester UK, 1996.
- [2] M.D. Schaeberle, H.R. Morris, J.F. Turner, P. Treado, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 175A–181A.
- [3] E.N. Lewis, J. Dubois, *American Laboratory* 40 (2008) 18.
- [4] M.B. Sinclair, D.M. Haaland, J.A. Timlin, H.D.T. Jones, *Applied Optics* 45 (2006) 3283–3291.
- [5] A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, L. Duponchel, R. Tauler, in: R. Salzer, H.W. Siesler (Eds.), *Chemometric Tools for Image Analysis in Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Wiley-VCH, 2009, pp. 65–106.
- [6] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, C. de la Pezuela, *The Analyst* 123 (1998) 135R–150R.
- [7] G. Reich, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1109–1143.
- [8] J. Dubois, J.C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrai, E.N. Lewis, *Spectroscopy (Amsterdam)* 22 (2007) 40.
- [9] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 533–553.
- [10] Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, *Analytica Chimica Acta* 535 (2005) 79–87.
- [11] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683–700.
- [12] J.M. Amigo, J. Cruz, M. Bautista, S. Maspocho, J. Coello, M. Blanco, *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 696–713.
- [13] L. Zhang, M.J. Hensons, S.S. Sekulic, *Analytica Chimica Acta* 545 (2005).
- [14] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 70–79.
- [15] N.B. Gallagher, J.M. Shaver, E.B. Martin, J. Morris, B.M. Wise, W. Windig, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 73 (2004) 105–117.

- [16] T.M. Hanczewicz, J.H. Wang, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 77 (2005) 18–31.
- [17] J.M.P. Nascimento, J.M. Bioucas-Dias, *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 43 (2005) 898–910.
- [18] M. Berman, A. Phatak, R. Lagerstrom, B.R. Wood, *Journal of Chemometrics* 23 (2009) 101–116.
- [19] R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski, *Journal of Chemometrics* 9 (1995) 31–58.
- [20] R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30 (1995) 133–146.
- [21] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 76 (2005) 101–110.
- [22] A. de Juan, S.C. Rutan, M. Maeder, R. Tauler, M.C.R. Chapters, in: D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 325–344, 249–257, 473–503.
- [23] J. Cruz, M. Bautista, J.M. Amigo, M. Blanco, *Talanta* 80 (2009) 473–478.
- [24] S. Piqueras, L. Duponchel, R. Tauler, A. de Juan, *Analytica Chimica Acta* 705 (2011) 182–192.
- [25] J.H. Wang, P.K. Hopke, T.M. Hanczewicz, S.L.L. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 476 (2003) 93–109.
- [26] L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43 (2007) 2057–2067.
- [27] A. Savitzky, M.J.E. Golay, *Analytical Chemistry* 36 (1964) 1627–1639.
- [28] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Applied Spectroscopy* 43 (1989) 772.
- [29] A. de Juan, R. Tauler, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36 (2006) 163–176.
- [30] M.B. Lopes, J.C. Wolf, J.M. Bioucas-Dias, M.A.T. Figueiredo, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 1462–1469.
- [31] C. Manson, M. Maeder, M. Whitson, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 1587–1594.
- [32] Pierre M. Gy, *Sampling for Analytical Purposes*, John Wiley & Sons, England, 1998.
- [33] K.H. Esbensen, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 88 (2009) 41–59.
- [34] R. Manne, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 27 (1995) 89.

Chemometric Strategies To Unmix Information and Increase the Spatial Description of Hyperspectral Images: A Single-Cell Case Study

S. Piqueras,^{†,‡} L. Duponchel,[§] M. Offroy,[§] F. Jamme,^{▽,⊥} R. Tauler,[‡] and A. de Juan^{*,†}

[†]Chemometrics Group, Department of Analytical Chemistry, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

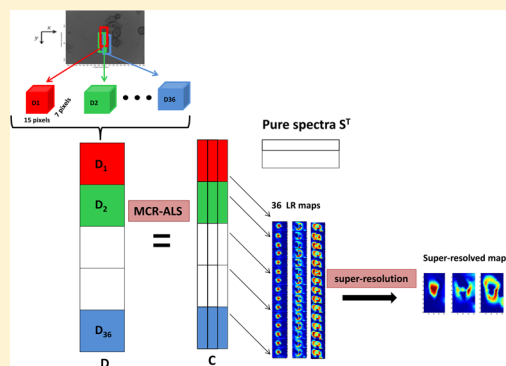
[‡]IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18, 08028 Barcelona, Spain

[§]LASIR CNRS UMR 8516, Université Lille 1, Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

[▽]INRA, UAR 1008, CEPIA, rue de la Géraudière, BP 71627, F-44316 Nantes, France

[⊥]Synchrotron SOLEIL, L'orme des merisiers, BP 48, Saint Aubin, F-91192 Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT: Hyperspectral images are analytical measurements that provide spatial and structural information. The spatial description of the samples is the specific asset of these measurements and the reason why they have become so important in (bio)chemical fields, where the micro-distribution of sample constituents or the morphology or spatial pattern of sample elements constitute very relevant information. Often, because of the small size of the samples, the spatial detail provided by the image acquisition systems is insufficient. This work proposes a data processing strategy to overcome this instrumental limitation and increase the natural spatial detail present in the acquired raw images. The approach works by combining the information of a set of images, slightly shifted from each other with a motion step among them lower than the pixel size of the raw images. The data treatment includes the application of multivariate curve resolution (unmixing) multiset analysis to the set of collected images to obtain the distribution maps and spectral signatures of the sample constituents. These sets of maps are noise-filtered and compound-specific representations of all the relevant information in the pixel space and decrease the dimensionality of the original image from hundreds of spectral channels to few sets of maps, one per sample constituent or element. The information in each compound-specific set of maps is combined via a super-resolution post-processing algorithm, which takes into account the shifting, decimation, and point spread function of the instrument to reconstruct a single map per sample constituent with much higher spatial detail than that of the original image measurement.



Hyperspectral images are powerful analytical measurements that contain spatial and structural (spectral) information about sample surfaces or volumes. The main specificity of hyperspectral images lies in the spatial aspect, since information about the distribution of the constituents on the samples can be obtained.^{1,2} Such spatial knowledge can be linked to general properties of samples, such as the heterogeneity in pharmaceutical or food formulations, and is especially relevant for biological samples, where the morphology and distribution of particular biological elements or tissues helps in the diagnosis of pathologies or in the general understanding of biological systems. In the biological/biomedical field, having sufficient spatial detail in the image is crucial to obtaining the desired information. The spatial detail depends on the spatial resolution provided by the image acquisition system and the pixel density of the image.

In recent years, there has been increasing interest in using infrared imaging to study biological samples, some of them as small as single biological cells.^{3–8} Infrared (IR) spectroscopy is particularly suitable for bioanalytical purposes, since it is

sensitive to a large variety of biomolecules, such as proteins, lipids, and diverse phosphorylated molecules, that are present in cells. Therefore, IR imaging is able to provide biospectroscopic chemical maps, furnishing detailed knowledge of the distribution of the different biological elements, the composition of which is defined by specific mixtures of the molecules mentioned above.⁹ The main limitation linked to images of single cells and, in general, of very small bio(chemical) samples is that the spatial resolution provided by commercial laboratory instruments is generally low and does not provide enough detail on the sample structure.¹⁰ Only very powerful instruments with a highly energetic and focused light beam, such as those found in synchrotron facilities or measures obtained by near-field spectroscopy, are likely to provide enough spatial resolution in the raw image.¹¹ However, synchrotron measures present a higher signal-to-noise ratio, because of the brightest IR source.

Received: February 19, 2013

Accepted: May 23, 2013

Published: May 23, 2013

Therefore, it is necessary to provide strategies that may help to increase the spatial detail of hyperspectral images obtained in less-performing equipments or in a faster (bigger pixel size) acquisition mode. To do so, methodologies based on the proper use of chemometric tools for image analysis can be of help.¹⁰

The methodology tested in this work aims at obtaining distribution maps of the sample constituents in an image (the biological elements of a single cell in our case study) with more spatial detail than that provided by the original image acquisition system. To do so, a combination of the information contained in a set of properly designed low-resolution (or low-pixel-density) images obtained on the same sample and the application of suitable chemometric methods is proposed. The set of low-resolution images are obtained so that they are shifted from each other by a very small motion step in the X – Y directions in the focal plane. From an instrumental point of view, the key aspect is that many image acquisition systems have a motion step of the motorized sample support significantly smaller than the minimum pixel size. Once the set of low-resolution images is obtained, the chemometric methodology passes by (1) the recovery of the distribution maps of the sample constituents (biological elements in the cell) by multiset analysis of all low-resolution raw images with multivariate curve resolution–alternating least-squares (MCR-ALS)^{12,13}, and (2) the production of very spatially detailed distribution maps, combining the information in all low-resolution maps by using a post-processing algorithm that takes into account the shifting and decimating of the images and the point spread function linked to the image acquisition.¹⁴

The relevance and novelty of the approach is in the two operations performed. First, obtaining a set of coherent and reliable distribution maps of low spatial resolution linked to the sample constituents would not be ensured unless multiset image analysis was carried out, which is an approach yet seldom used in this field. Second, post-processing algorithms combining low-resolution images with the goal of increasing the spatial description of the sample have only been applied to gray scale images or, at the most, to RGB images (one color channel at a time). For the first time, these algorithms are tried in hyperspectral images in a fast and informative/efficient way. Thus, instead of applying these methods to one spectral channel at a time with the related huge computational cost, they are applied to the small number of sets of informative distribution maps provided by the multiset analysis (one per each sample constituent). This novel and recommendable strategy simultaneously saves computation time and, above all, provides unmixed constituent-specific interpretable information on the sample analyzed.

This approach is tested on IR images collected on a HeLa cell.¹⁵ [A HeLa cell is a human cervical epithelial cell line, which is one of the most commonly used cell lines in biomedical research.]

Testing and validation of the approach presented will be performed by using two types of images taken on the same cell sample via synchrotron infrared microspectroscopy: a high-resolution cell image (0.8 μm pixel size), collected with the highest spatial resolution of the synchrotron and used as a reference, and a set of low-pixel-density cell images (3.5 μm pixel size), shifted from each other by a motion step of 0.6 μm in the x - or y -directions. Comparison of the obtained distribution maps and related pure spectra from the reference high-resolution HeLa cell image with those from the treatment

of the set of low-resolution image cells by the proposed data processing strategy will help to support the validity of the approach proposed.

The methodology presented is not only meant to be applied to biological images but, in general, to images obtained with any image acquisition system, when an improvement of the spatial detail of the image constituent maps derived from the instrumental measurement wants to be obtained.

■ IMAGE SAMPLES AND IMAGE ACQUISITION

The images obtained are from a single HeLa cell. The HeLa cells used to perform the culture were kindly donated by Denis Biard from CEA-DSV-iRCM/INSERM U935, Institut A. Lwoff-CNRS (Villejuif Cedex, France). Before seeding the cells for microscopic observations, the IR low-e microscopes slides (MirrIR, Kevley Technologies) were sterilized by autoclaving in 120 °C. Cells were incubated for 3 days in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with fetal calf serum (FCS), during which cell attachment and growth was monitored by visible inspection using a microscope. Low-e microscopes slides with desired cell growth confluence were rinsed with DMEM, in the absence of FCS or antibiotics, for 1–2 min. Thereafter, the cells were fixed in 1.6% phosphate buffer solution (PBS)—diluted formaldehyde at room temperature for 20 min, rinsed in distilled water for 5 s, and air-dried before being used for IR spectral acquisition.

All IR hyperspectral images were acquired at the SOLEIL Synchrotron (Gif sur yvette, France, SMIS beamline, proposal 20100914/20090553). The Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer used was a Thermo Nicolet 5700 coupled to a Nicolet Continuum XL microscope for IR microspectroscopy that allows simultaneous IR spectra collection and visible information of the sample. The detector of the IR microscope was a liquid-nitrogen-cooled mercury cadmium telluride (MCT-A) detector (50 μm pixel size). The microscope was operating in reflection geometry, in confocal mode using a 32 \times infinity corrected Schwarzschild objective (NA = 0.65). All spectra were obtained using a double-path single masking aperture size of 6 $\mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$. Spectra were collected in the infrared region (4000–1000 cm^{-1}), where $\nu = 436$ wave-numbers are being recorded at a resolution of 16 cm^{-1} with 50 coadded scans. Absorbance readings were used for all data treatments.

With respect to the conditions used during the mapping, the images acquired were from two different types of cells:

- HeLa cell image of high spatial resolution. This image has a pixel size of 0.8 μm . The image size is $63 \times 28 \times 436$ ($x \times y \times \nu$, where x and y are the number of pixels in the x - and y -directions and ν represents the number of spectral channels per spectrum).
- HeLa cell images of low pixel density. A set of 36 images with a pixel size of 3.5 μm was acquired with an image size of $15 \times 7 \times 436$ ($x \times y \times \nu$). Each of these images is shifted from the closest one by a motion step of 0.6 μm in the x - or y -directions. Shifts in the x - and y -directions, with respect to the original image, range from 1 to 6 times 0.6 μm .

■ DATA TREATMENT

The data treatment consists of three different steps: a pre-processing of the image spectra to correct for scattering effects, the application of a multivariate resolution method to obtain

the distribution maps and related pure spectra of the image constituents and, in the case of the set of low-pixel-density images, a post-processing step to combine all distribution maps obtained into a single map per constituent with much higher spatial detail. The next subsections describe the steps mentioned above.

Data Pre-processing. IR spectra of single biological cells often exhibit a scattering effect. This scattering, denominated Mie scattering, may produce a broad oscillation in the baseline of the spectrum and can lead to distortions in both the position and intensity of absorption bands.^{16–19} The image raw spectra should be corrected to extract the unbiased and real chemical information. We propose, for the first time, the Asymmetric Least-Squares (AsLS) algorithm to remove this type of scattering effect, since it is able to cope with irregular and intense baselines without assuming any predefined baseline shape.²⁰

AsLS, which was proposed originally by Eilers to subtract baselines in chromatography, is a sophisticated baseline correction method capable of handling irregularly shaped baselines that change from pixel to pixel. This capability has been successfully tested to correct large fluorescent contributions in Raman images.²¹ The AsLS method is based on a recursive local fitting of the entire spectrum with a baseline obtained by using a Whittaker smoother.²² In each iterative cycle, the spectral channels that provided positive residuals in the previous iteration (i.e., those channels where there is an absorption band) are downweighted in the baseline fitting operation. After a small number of fitting cycles, no more variation occurs and the fitted baseline obtained is used to correct the spectrum. Two parameters are tuned according to the shape of the baseline: one is linked to the smoothness (λ) of the fit and one is associated with the penalty imposed to the points giving positive residuals in the fit (p). This type of correction was particularly useful in Raman spectra, where the baseline is smoother and has a significantly lower frequency than the spectral features.²³ This is the same situation found for the Mie scattering in IR images, which provides a smoother and broader baseline than the IR spectral features.

Hyperspectral Image Resolution. The goal of hyperspectral image resolution and, consequently, of Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) is the decomposition of the raw image spectra (\mathbf{D}) into the distribution maps (matrix \mathbf{C}) and pure spectra of the constituents (\mathbf{S}^T) present in the sample imaged. This decomposition is carried out according to the bilinear model shown in eq 1:^{12,13,23–27}

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

where \mathbf{D} contains the raw spectra of the image, \mathbf{C} is the matrix of concentration profiles of the image constituents, and \mathbf{S}^T is the matrix of their related pure spectra. \mathbf{E} accounts for the experimental error contained in the raw measurement.

Although an image dataset can be visualized as a data cube (three dimensions, 3D), where two dimensions (x and y) are pixel coordinates and the third is the spectral dimension (ν), the data cube is unfolded into a matrix \mathbf{D} (two dimensions, 2D) with rows ($x \times y$ pixels) and columns (ν). After the MCR analysis of the raw image, the pure distribution maps of the image constituents can be obtained by folding back the stretched concentration profiles in \mathbf{C} to recover the original 2D spatial structure of the image.^{13,23,24,28,29}

MCR-ALS is an iterative resolution algorithm based on the following steps: (1) determination of the number of constituents in the raw image (\mathbf{D}) (e.g., by Singular Value Decomposition, SVD³⁰); (2) the generation of initial estimates (\mathbf{S}^T). In image analysis, they can be based on the selection of the purest pixel spectra (SIMPLISMA);³¹ and (3) Alternating Least-Squares (ALS) calculation of \mathbf{C} and \mathbf{S}^T under constraints until convergence of the iterative optimization is achieved.

Step 3 involves the operations $\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}^T\mathbf{S}^T\mathbf{S}^{-1}$ and $\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$, respectively. The end of the iterative process takes place when the reproduction of the original image from the product $\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ has enough quality and there is no significant variation among the results of consecutive cycles. The quality of the model MCR-ALS is measured with parameters, such as the lack of fit (lof) and the percentage (r^2).

Explained variance (r^2):

$$r^2 (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{\sum_{i,j} \mathbf{e}_{ij}^2}{\sum_{i,j} \mathbf{d}_{ij}^2} \right) \quad (2)$$

Lack of fit (lof):

$$\text{lof} (\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} \mathbf{e}_{ij}^2}{\sum_{i,j} \mathbf{d}_{ij}^2}} \quad (3)$$

where \mathbf{e}_{ij} are the elements of the \mathbf{E} matrix and \mathbf{d}_{ij} are the elements of the raw dataset \mathbf{D} . Subindexes i and j refer to the pixel and the wavenumber, respectively.

During the ALS steps, constraints are used to introduce information to model the \mathbf{C} and \mathbf{S}^T profiles and to decrease the ambiguity effects in the final results obtained.^{23,25–27,32} In image resolution, non-negativity in the concentration and the spectral direction is the most commonly used constraint. In our case, this constraint is also applied because the concentration of the constituents in the image and the spectroscopic readings of the AsLS-corrected IR spectra are positive.^{21,23} Normalization of pure spectra in \mathbf{S}^T is also a common constraint used to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization (2-norm is normalizing to unit length in this case).

Often, the simultaneous analysis of several images can be of interest. In this case, multiset structures or augmented data matrices \mathbf{D} are built that contain different submatrices \mathbf{D}_i . Clearly, image multiset analysis is based on the bilinear model based on the Beer–Lambert law (see eq 1). Thus, the pixel spectra of all images are organized in a data table \mathbf{D} , where a block (or submatrix) belongs to a particular image. The decomposition $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$ provides a single matrix \mathbf{S}^T of pure spectra, valid for all the images analyzed, and a matrix \mathbf{C} , formed by as many submatrices as images in the multiset structure. The profiles in each of these submatrices can be refolded conveniently to recover the related distribution maps of each image (see Figure 1).

The modulus operand of MCR-ALS for image multiset analysis is essentially identical to the analysis of a single image, with the addition that the concentration submatrices linked to the different images can be constrained differently, if needed. In our case, all submatrices in \mathbf{C} were constrained to be non-negative. Additional typical information associated with image multiset analysis and encoded as a constraint concerns the presence/absence of constituents in the different images.^{12,13,23} In this example, all contributions were present in all low-pixel-density images; therefore, this constraint was not relevant.

▪ Multiset image structures

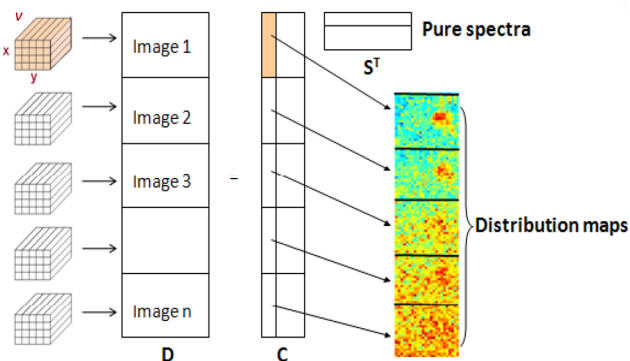


Figure 1. Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS) analysis of an image multiset, where x , y are spatial pixels and v represents the wavenumbers of the spectra.

In this work, single image resolution analysis has been applied to the HeLa cell with high spatial resolution, whereas image multiset resolution has been applied to analyze the set of low pixel density images simultaneously.

Post-processing (Super-Resolution Strategy). Super-resolution algorithms traditionally work by combining sets of gray scale images from the same sample slightly shifted from each other with the objective of obtaining a single image with higher spatial detail.¹⁴ Since they are designed to work on images with a single observation per pixel, there is no straightforward way to apply these procedures to hyperspectral images, where hundreds or thousands measurements are obtained per each pixel (i.e., a full spectrum). A possibility would be combining the set of images at each particular spectral channel, but this would be a very time-consuming task³³ and more-efficient approaches can be envisioned.

The proposal of this work is to use the super-resolution algorithm on the sets of distribution maps obtained from the multiset analysis of the low-pixel-density HeLa cell images. In doing so, time is saved because only few sets of distribution maps (one per each image constituent) have to be combined versus hundreds or thousands sets of single spectral channel raw images if the resolution (unmixing) step was avoided. All of the relevant information of the original hyperspectral image is kept because distribution maps are faithful and interpretable compressed representations of the image pixel space,²⁰ and the additional advantage is that the final outcome is a small number of very detailed single distribution maps with constituent-specific information, instead of raw mixed images with higher resolution.

The use of the super-resolution algorithm to combine the set of distribution maps obtained for a single image constituent is described below. More-detailed information on the general algorithm has been given in different papers.^{34–36}

The process starts with N resolved low-resolution (or low-pixel-density) maps $\{C_k\}_{k=1}^N$ of a particular image constituent, where each map is defined by $M_1 \times M_2$ pixels. These low-resolution maps can be considered worse and different representations of a single map of much-higher resolution C_{sr} ($L_1 \times L_2$ pixels) that wants to be recovered, where $L_1 > M_1$ and $L_2 > M_2$ for $1 \leq k \leq N$. Considering the 36 shifted maps in our experiment, $N = 36$, $M_1 = 15$, $M_2 = 7$, $L_1 = 90$, and $L_2 = 42$. L_1 and L_2 are user-defined parameters, which always satisfy the following rule of thumb:

$$L_1 L_2 \leq N M_1 M_2 \quad (4)$$

Let $L_1 = k M_1$ and $L_2 = k M_2$. We must select the highest k -value satisfying eq 4 and take into account N , M_1 , and M_2 , i.e., $k = 6$. That is why $L_1 = 90$ and $L_2 = 42$. The super-resolution concept considers that each measured low-resolution map C_k is the result of a particular translation, linear space-invariant

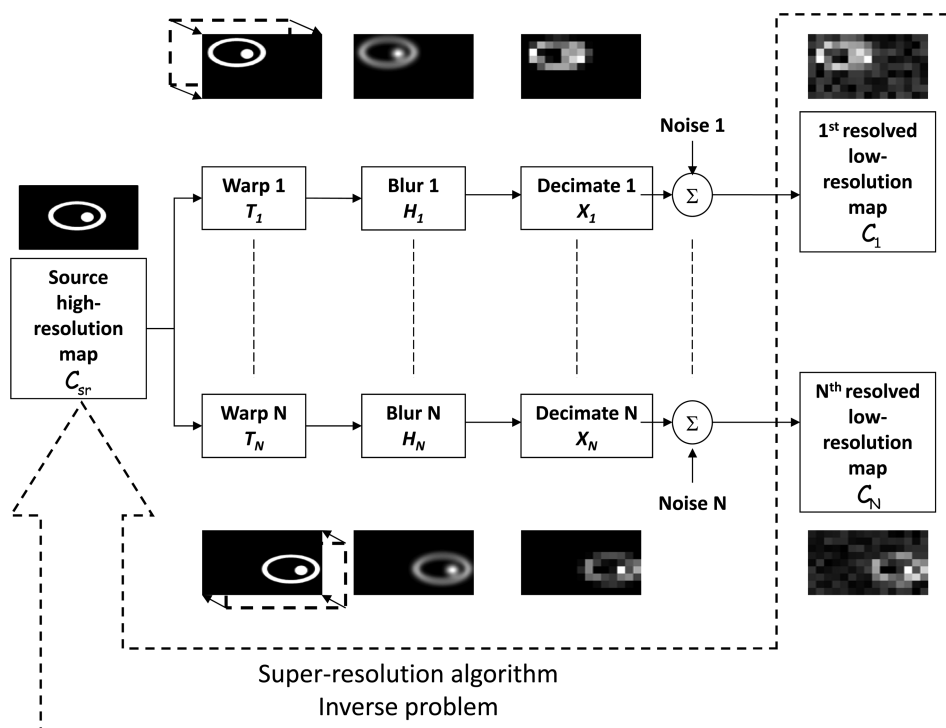


Figure 2. Scheme of the super-resolution algorithm.

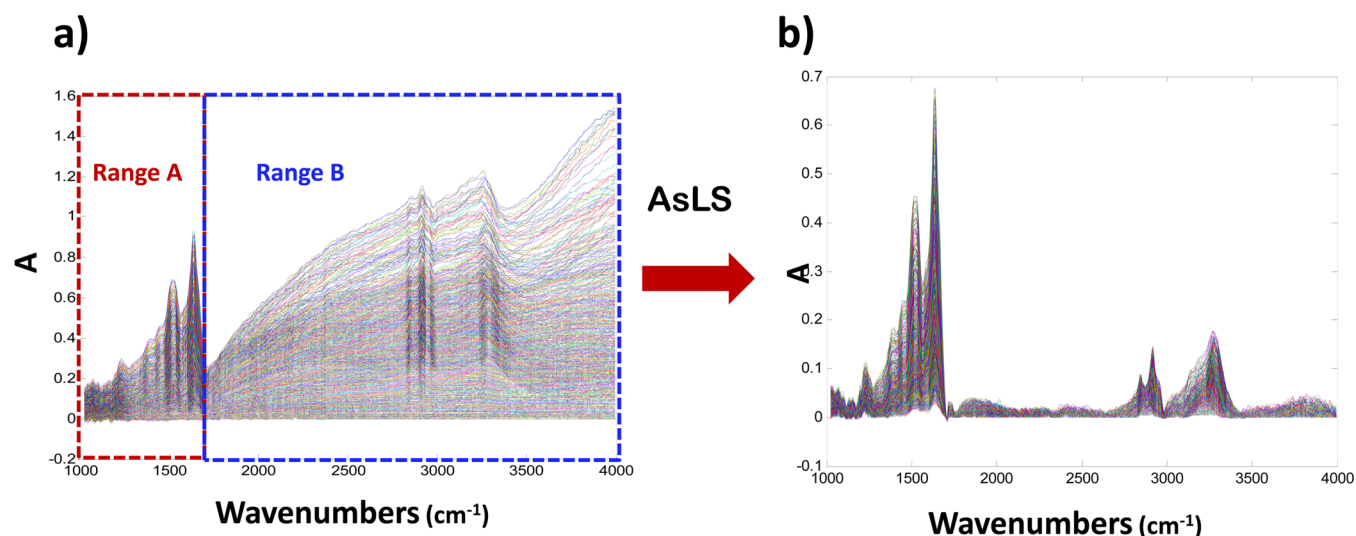


Figure 3. Asymmetric Least Squares (AsLS) correction of Mie scattering: (a) raw IR spectra and (b) AsLS-corrected spectra of a high-resolution image of a single HeLa cell.

blurring, and uniform rational decimation performed on the ideal high-resolution map C_{sr} . Additive Gaussian noise is also considered to be corrupting the low-resolution images. In other words, each low-resolution map is a noisy, decimated, blurred, and warped version of the original high-resolution map. A map formation/degradation model can then be used in order to describe these successive transformations:

$$C_k = X_k H_k T_k C_{sr} + E_k \quad (5)$$

The effect of each of the operations considered in the model is displayed in Figure 2. The matrix T_k , sized $[L_1 L_2 \times L_1 L_2]$ corresponds to the geometric translation between the C_{sr} map and C_k . The matrix H_k , sized $[L_1 L_2 \times L_1 L_2]$ is the blur matrix defined by the optical system Point Spread Function. The Point Spread Function describes the response of an imaging system (i.e., the 2D distribution of light in the focal plane), onto a point source or point object. The matrix X_k , sized $[M_1 M_2 \times L_1 L_2]$ corresponds to the decimation resulting in C_k i.e., the reduction of the number of observed pixels in the measured images. The additive Gaussian noise observed in the k -th map is described by E_k . Considering a generalization of this model applied to all N low-resolution maps, we have

$$\begin{bmatrix} C_1 \\ \vdots \\ C_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 H_1 T_1 \\ \vdots \\ X_N H_N T_N \end{bmatrix} C_{sr} + \begin{bmatrix} E_1 \\ \vdots \\ E_N \end{bmatrix} \quad (6)$$

Here, super-resolution becomes an inverse problem since C_{sr} must be found from the known set of low-resolution maps $\{C_k\}_{k=1}^N$ and the estimations of X_k , H_k and T_k matrices for all $k = 1, \dots, N$. For our spectroscopic experiment, T_k matrices are just defined by the shift between low-resolution maps $\{C_k\}_{k=1}^N$, with respect to one of them taken as a reference. These shifts are translations, which are multiple of $0.6 \mu\text{m}$, which is the XY stage motion step between two image acquisitions. For the super-resolution concept, these shifts must be lower than the size of the pixel of the low-resolution image (i.e., $3.6 \mu\text{m}$ in our case). Moreover, because all low-resolution images are obtained with the same optical system, we consider here

$$\forall k, H_k = H$$

Generally, this matrix is estimated from a spatial resolution evaluation, but even a rough guess of it, like a Gaussian filter can be used. The matrix X_k depends only on the decimation ratio between the high-resolution map and the resolved low-resolution maps, i.e., the ratio between the numbers of pixels of the two. Ultimately, taking these things into consideration, it is now possible to retrieve the high-resolution map C_{sr} with a classical restoration method, such as Maximum A Posteriori (MAP) estimation.^{37–39} MAP estimation comes from Bayesian statistics. It is generally used to obtain a point estimate of an unobserved quantity on the basis of empirical data. It is closely related to Maximum Likelihood (ML) method, but employs an optimization objective, which incorporates a prior distribution over the quantity that one wants to estimate. A regularisation procedure is necessary in order to find a stable solution of C_{sr} because of the high dimension of the equation system (eq 6) and inherent numerical instability of such inverse problems. The “Norm 1 + Bilateral Total Variation” regularization algorithm^{34,35} was then chosen to retrieve the super-resolved maps in this work.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of Raw Spectra. The raw spectra of the high-resolution image of single HeLa cell are shown in Figure 3a. As previously discussed, the spectra show a broad lump in the baseline between 1800 and 4000 cm^{-1} associated with Mie scattering.

Two different spectral ranges can be differentiated in the raw spectra: one linked to Amide I and II bands between 1450 and 1700 cm^{-1} and a second one, at higher wavenumbers, where the baseline contribution seems to be more dominant. In these higher wavenumbers, there are bands related to C–H stretching in the region 2800 – 2960 cm^{-1} and bands in the region 2960 – 3400 cm^{-1} assigned to OH and NH stretching modes.⁴ The bands of both regions provide information on the chemical composition and, hence, biological elements of the HeLa cell.

Pre-processing for Mie Scattering Correction. AsLS was applied to the raw spectra of the high-resolution image to remove the Mie scattering effect. The raw spectra of the high-resolution image present a large irregular baseline, where two

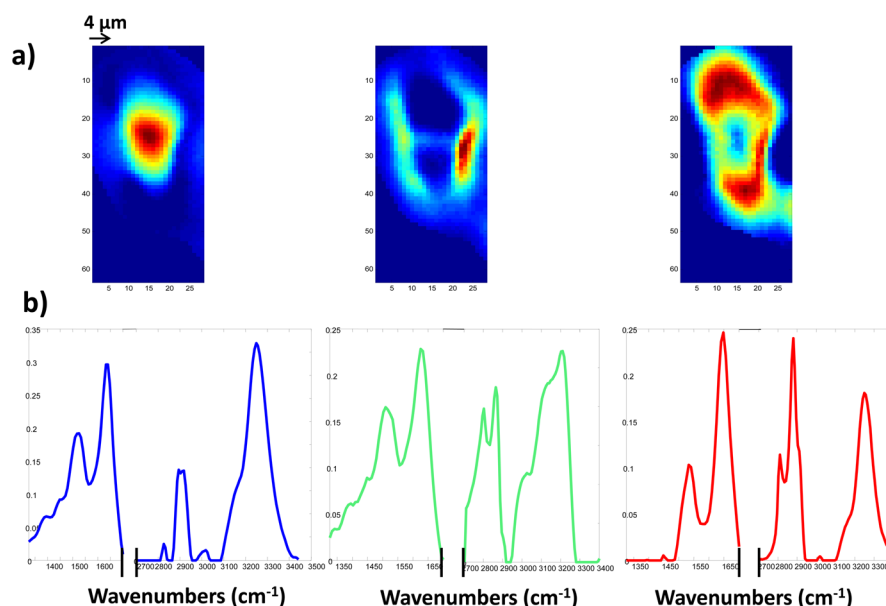


Figure 4. MCR-ALS results of a high-spatial-resolution cell image. Panel (a) (top plots) show distribution maps of the nucleus, membrane, and cytoplasm, whereas panel (b) (bottom plots) show the corresponding spectral signatures.

spectral zones can be differentiated (range A and range B), since the baseline intensity increases predominantly after 1750 cm^{-1} . AsLS was applied separately in these two spectral ranges, setting different p and λ parameters, and the Mie scattering was removed satisfactorily (see Figure 3b).

Analysis of the High-Spatial-Resolution HeLa Cell Image: MCR-ALS of a Single Image. After Mie scattering correction by AsLS, we have selected the spectral ranges between 1300 and 1700 cm^{-1} and 2800 – 3400 cm^{-1} to be submitted for resolution analysis.

SVD analysis indicated the presence of three contributions on the Mie corrected data for the high-spatial-resolution image of the HeLa cell. SIMPLISMA was used in the generation of initial estimates to select the purest spectra in the high-resolution image of the HeLa cell. MCR-ALS analysis was performed under the constraints of non-negativity in concentration profiles and spectra and with spectra normalization in matrix S^T . Figure 4 shows the final results of distribution maps and pure spectra for the high spatial resolution image of HeLa cell.

The resolution results obtained provide a good data description with a lack of fit of 7.6%, which seems to support the right choice in the number of contributions needed to describe the image. The interpretability of the distribution maps and pure spectra related to these contributions are the second check to confirm the validity of the resolution results. Indeed, the distribution maps obtained are very consistent with the structure of the sample analyzed: the HeLa cell. Thus, Figure 4a shows distribution maps clearly representing the different cell regions: nucleus, cellular membrane, and cytoplasm. All these maps have a pixel size of $0.8\text{ }\mu\text{m}$.

In the different pure spectra recovered (see Figure 4b), spectral bands characteristic of proteins and lipids can also be identified. Thus, the mid-IR region (1800 – 800 cm^{-1})—also referred to as the “fingerprint” region—contains the stretching vibration of the ester linkage of lipids at $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ and the most dominant spectral features are the amide I protein vibration (centered at $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$) and the band at 1550 cm^{-1} , which corresponds to the amide II band. The amide I

vibration is the excitation-coupled $\text{C}=\text{O}$ stretching manifold and, consequently, is sensitive to both peptide and protein secondary structure, whereas the amide II vibration is due mostly to the peptide $\text{C}-\text{N}$ stretching motion. The vibrations of the amide group (CONH) of proteins contributed to all of the pure spectra but was most dominant in the resolved nucleus spectrum, as expected. In the region of 2800 – 3000 cm^{-1} , the $\text{C}-\text{H}$ stretching vibrations of phospholipids, protein side chains, and nucleic acid sugars and bases are observed. The signals observed in the region of 2950 – 3400 cm^{-1} result from both the OH and NH stretching modes (H_2O , proteins, and polysaccharides) but the most prominent spectral feature in this region is the protein amide A vibration at $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$, this being due mostly to the peptide linkage $\text{N}-\text{H}$ stretching mode. The resolved spectra of the cellular membrane and the cytoplasm still present a significant signal in the amide I and amide II bands, but show more dominant features in the spectral range of higher wavenumbers, as expected from the composition of these biological elements.

MCR-ALS analysis has proven to be an efficient method to map the different biological regions of a single cell. The distribution maps and resolved spectra of this high-spatial-resolution single image will be taken as reference to validate the results obtained by the multiset analysis and super-resolution post-processing performed on the set of low-spatial-resolution images.

Increasing the Spatial Detail of a Set of Low-Pixel-Density Images of the HeLa Cell: MCR-ALS Multiset Analysis and Super-Resolution Post-processing. As mentioned in previous sections, the set of low-pixel-density cell images was acquired by shifting the images from each other spatially in the x - and y -dimensions. In this way, 36 images with a pixel size of $3.5\text{ }\mu\text{m}$, shifted $0.6\text{ }\mu\text{m}$ from each other in the x or y -direction, were recorded.

MCR-ALS analysis was performed on the 36 low-pixel-density images, structured as a column-wise augmented matrix, since the spectral direction is common to all images (see Figure 1). Pre-processing by Asymmetric Least Squares (AsLS) was adopted using the same p and λ parameters that were used for

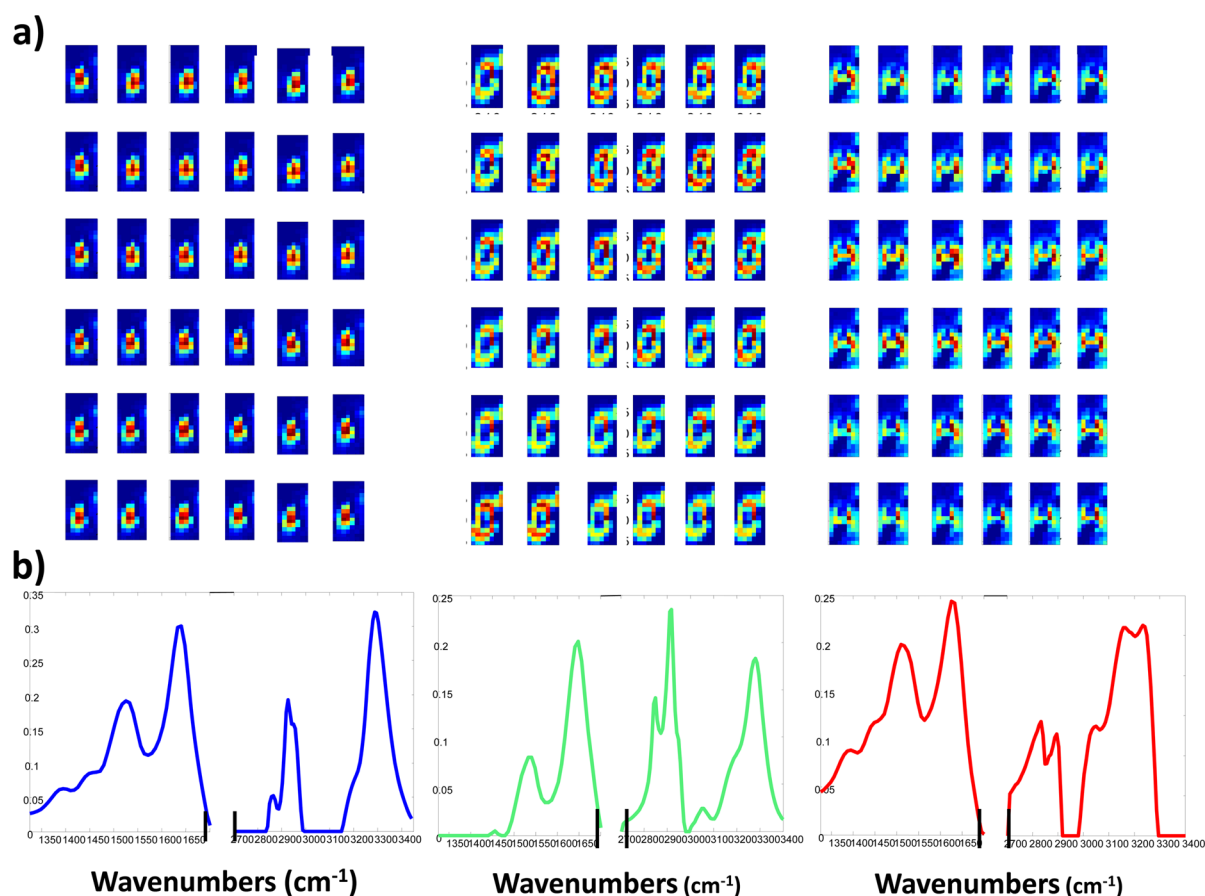


Figure 5. MCR-ALS results of image multiset analysis of low-spatial-resolution cell images: (a) sets of distribution maps of nucleus, membrane, and cytoplasm; and (b) related spectral signatures.

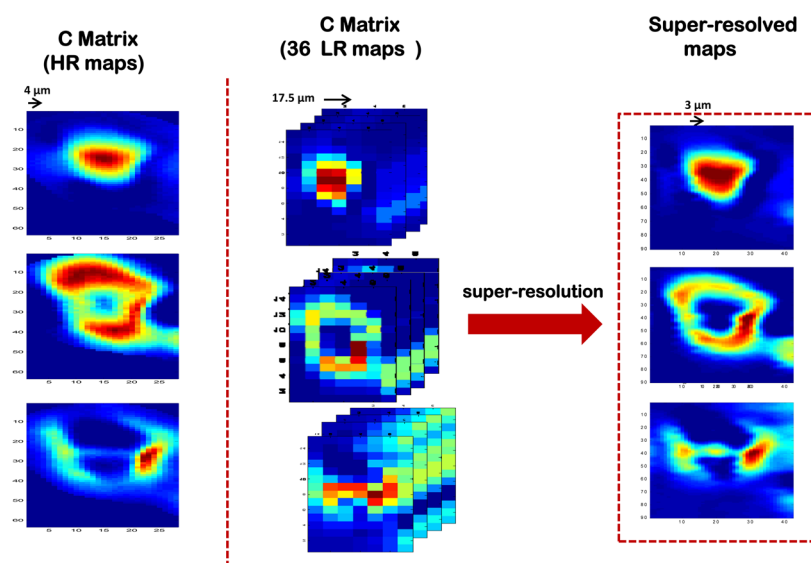


Figure 6. Comparison of distribution maps obtained from MCR-ALS analysis of a high-resolution cell image (left plots), MCR-ALS analysis of image multiset analysis of low-spatial-resolution cell images (center plots), and post-processed low-resolution maps determined by using the super-resolution algorithm (right plots).

the high-spatial-resolution image. MCR-ALS was applied on the multiset structure containing the AsLS-corrected spectra. Initial estimates of pure spectra were obtained by SIMPLISMA applied to the full multiset of low-resolution images. The constraints applied in the resolution analysis were non-

negativity in the concentration profiles and spectra and normalization of spectra in S^T .

Figure 5 shows the results of the MCR-ALS analysis of the multiset structure formed by the 36 low-pixel-density images of the single HeLa cell. The distribution maps of each image are displayed in Figure 5a, and the related spectra are shown in

Figure 5b. The lack of fit was 8.2%, which is satisfactory for IR biomedical images. The resolved spectra in Figure 5b are very similar to those shown in the analysis of the single high-resolution image (see Figure 4b). This is a very relevant result, because it shows that the pure spectral signatures obtained from a high-spatial-resolution image can also be recovered by the multiset analysis of low-pixel-density cell images. It is important to note that this is only possible because of the simultaneous treatment of the complementary information of the shifted images in the multiset structure. Recovering the same spectral signatures as those in the high-spatial-resolution image is of vital importance, since this ensures that the related distribution maps also refer to the same cell contributions.

The distribution maps resolved from the set of low-pixel-density images can be recognized as nucleus, cytoplasm, and membrane; however, they are blurred and present low spatial definition, as expected from the larger pixel size in the original measurements performed. Now, each cell region is represented by 36 distribution maps, shifted slightly from each other. To obtain a single distribution map with higher detail, the super-resolution post-processing step is required. Thus, the super-resolution post-processing is applied separately to each set of 36 low-pixel-density distribution maps linked to a particular cell contribution. From the combination of these 36 maps, 15×7 pixels in size, with a pixel size of $3.5 \mu\text{m}$ and obtained with a motion step of $0.6 \mu\text{m}$ between them in the x - or y -direction, a single super-resolved map is obtained. This new super-resolved map has a pixel size of $0.6 \mu\text{m}$, which is equal to the motion step among the images, and a total map size of 90×42 pixels.

Figure 6 shows the enormous similarity, in terms of meaning and spatial detail, among the distribution maps of cell, nucleus, and cytoplasm obtained by direct MCR-ALS analysis of the high-spatial-resolution image cell and that obtained by multiset analysis of a set of low-pixel-density images collected on the same sample and super-resolution post-processing of the obtained sets of distribution maps.

The similarity in the results obtained by both approaches is not only relevant for the presented example, but it is of general applicability for any other study based on the use of hyperspectral images and supports the possibility of increasing the intrinsic spatial resolution of the working spectroscopic setup.

CONCLUSIONS

The strategy proposed, consisting of a proper design in the acquisition of series of hyperspectral images with a small motion step among them, as small as the pixel size desired, combined with suitable chemometric tools (MCR-ALS image multiset analysis and super-resolution post-processing) opens up a way to surmount the instrumental limitation of spatial detail in any hyperspectral image acquisition system. The adaptation of the super-resolution post-processing for hyperspectral images should necessarily pass through the use of the distribution maps obtained from a set of low-spatial-resolution (or low-pixel-density) images analyzed by multiset MCR-ALS analysis as starting-point information. This strategy overcomes the problem of computation time that could arise if sets of raw hyperspectral images at hundreds or thousands of spectral channels had to be processed individually and provides better results, expressed as detailed noise-filtered maps with constituent-specific information.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: anna.dejuan@ub.edu.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to P. Dumas for assistance and to the SOLEIL staff for smoothly running the synchrotron facility. S. Kascakova is thanked for performing the cell culture. S.P. thanks the Spanish government for a Ph.D. grant, and A.J., S.P., and R.T. acknowledge financial support through Project No. CTQ2012-38616.

REFERENCES

- (1) de Juan, A.; Maeder, M.; Hanczewicz, T.; Duponchel, L.; Tauler, R. Chemometric Tools for Image Analysis. In *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*; Salzer, R., Siesler, H. W., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2009.
- (2) Geladi, P.; Grahn, H. *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis*; Wiley: Chichester, U.K., 1996.
- (3) Sulé-Suso, J.; Skingsley, D.; Sockalingum, G. D.; Kohler, A.; Kegelaer, G.; Manfait, M.; El Haj, A. J. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *38*, 179–184.
- (4) Jamin, N.; Dumas, P.; Moncuits, J.; Fridman, W. H.; Teillaud, J. L.; Carr, G. L.; Williams, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 4837–4840.
- (5) Bassan, P.; Kohler, A.; Martens, H.; Lee, J.; Byrne, H. J.; Dumas, P.; Gazi, E.; Brown, M.; Clarke, N.; Gardner, P. *Analyst* **2010**, *135*, 197–224.
- (6) Dumas, P.; Miller, L. *Vib. Spectrosc.* **2003**, *32*, 3–21.
- (7) Wood, B. R.; Chiriboga, L.; Yee, H.; Quinn, M. A.; McNaughton, D.; Diem, M. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *93*, 59–68.
- (8) Diem, M.; Romeo, M.; Matthäus, C.; Miljkovic, M.; Miller, L.; Lasch, P. *Infrared Phys. Technol.* **2004**, *45*, 331–338.
- (9) Gazi, E.; Dwyer, J.; Lockyer, N. P.; Miyan, J.; Gardner, P.; Hart, C. A.; Brown, M. D.; Clarke, N. W. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *38*, 193–201.
- (10) Dumas, P.; Jamin, N.; Teillaud, J. L.; Miller, L. M.; Beccard, B. *Faraday Discuss.* **2004**, *126*, 289–302.
- (11) Ostertag, E.; Merz, T.; Kessler, R. W.; Multimodal Spatially Resolved Near-Field Scattering and Absorption Spectroscopy. *Proc. SPIE* **2012**, 8231, 82310A (DOI: 10.1117/12.909086). [Also see: *Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications VIII*, San Francisco, CA, Jan. 24–37, 2011; Cartwright, A. N., Nicolau, D. V., Eds.; SPIE: Bellingham, WA, 2012 (ISBN 9780819488749).]
- (12) Piqueras, S.; Burger, J.; Tauler, R.; de Juan, A. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**, *117*, 169–182.
- (13) de Juan, A.; Tauler, R.; Dyson, R.; Marcolli, C.; Rault, M.; Maeder, M. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 70–79.
- (14) Duponchel, L.; Milanfar, P.; Ruckebush, C.; Huvenne, J. P. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *607* (2), 168–175.
- (15) Rahbari, R.; Sheahan, T.; Modes, V.; et al. *Biotechniques* **2009**, *46* (4), 277–284.
- (16) Bassan, P.; Byrne, H. J.; Lee, J.; Bonnier, F.; Clarke, C.; Dumas, P.; Gazi, E.; Brown, M. D.; Clarke, N. W.; Gardner, P. *Analyst* **2009**, *134*, 1171–1175.
- (17) Romeo, M.; Mohlenhoff, B.; Diem, M. *Vib. Spectrosc.* **2006**, *42*, 9–14.
- (18) Kohler, A.; Sulé-Suso, J.; Sockalingum, G. D.; Tobin, M.; Bahrami, F.; Yang, Y.; Pijanka, J.; Dumas, P.; Cotte, M.; Van Pettius, G.; Parkes, G.; Martens, H. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 259–266.
- (19) Lee, J.; Gazi, E.; Dwyer, J.; Brown, D.; Clarke, N. W.; Gardner, P. *Analyst* **2007**, *132*, 750–755.
- (20) Eilers, P. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 404–411.
- (21) Piqueras, S.; Duponchel, L.; Tauler, R.; de Juan, A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *705*, 182–192.

- (22) Eilers, P. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3631–3636.
- (23) de Juan, A.; Maeder, M.; Hancewicz, T.; Duponchel, L.; Tauler, R. Chemometric Tools for Image Analysis. In *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*; Salzer, R., Siesler, H. W., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2009; Chapter 2, pp 65–106.
- (24) Duponchel, L.; Elmi-Rayaleh, W.; Ruckebusch, C.; Huvenne, J. P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 2057–67.
- (25) Tauler, R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 133–46.
- (26) Tauler, R.; Smilde, A. K.; Kowalski, B. R. *J. Chemom.* **1995**, *9*, 31–58.
- (27) Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *76*, 101–10.
- (28) Patel, I.; Trevisan, J.; Evans, G.; Llabjani, V.; Martin-Hirsch, P. L.; Stringfellow, H. F.; Martin, F. L. *Analyst* **2011**, *136*, 4950.
- (29) de Juan, A.; Tauler, R. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 163–176.
- (30) Golub, G. H.; Reinsch, C. *Numer. Math.* **1970**, *14*, 403–420.
- (31) Windig, W.; Guilment, J. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1425–1432.
- (32) de Juan, A.; Tauler, R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 195–210.
- (33) Matsson, E. C.; Nasse, M. J.; Rak, M.; Gough, K. M.; Hirschmugl, C. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6173–6180.
- (34) Farsiu, S.; Robinson, M. D.; Elad, M.; Milanfar, P. *IEEE Trans. Image Process.* **2004**, *13*, 1327.
- (35) Farsiu, S.; Robinson, M. D.; Elad, M.; Milanfar, P. *IEEE Trans. Image Process.* **2004**, *14*, 47.
- (36) Nguyen, N.; Milanfar, P.; Golub, G. *IEEE Trans. Image Process.* **2001**, *10*, 573.
- (37) Schultz, R. R.; Stevenson, R. L. *IEEE Trans. Image Process.* **1994**, *3*, 233.
- (38) Hardie, R. C.; Barnard, K. J.; Armstrong, E. E. *IEEE Trans. Image Process.* **1997**, *6*, 1621.
- (39) Schultz, R. R.; Stevenson, R. L. *IEEE Trans. Image Process.* **1996**, *5*, 996.



Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis



S. Piqueras^{a,c,*}, L. Duponchel^b, R. Tauler^c, A. de Juan^a

^a Grup de Quimiometria, Dept. Química Analítica, Universitat de Barcelona, Spain

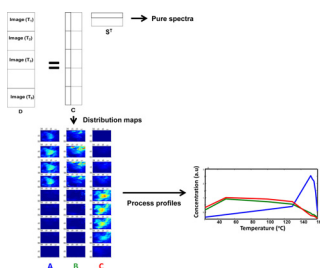
^b Université Lille-Nord de France, LASIR, CNRS-UMR 8516, F-59655, Villeneuve d'Ascq, France

^c Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Spain

HIGHLIGHTS

- Raman images and multiset analysis integrally describe polymorphic transformations.
- Multiset MCR-ALS analysis provides global (image) and local (pixel) process profiles.
- Spatial image information discriminates compounds with identical process profiles.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2013

Received in revised form 10 February 2014

Accepted 18 February 2014

Available online 21 February 2014

Keywords:

Image multiset analysis
Polymorphic transformations
Raman hyperspectral images
MCR-ALS

ABSTRACT

Polymorphism is often encountered in many crystalline compounds. To control the quality of the products, it is relevant knowing the potential presence of polymorph transformations induced by different agents, such as light exposure or temperature changes. Raman images offer a great potential to identify polymorphs involved in a process and to accurately describe this kind of solid-state transformation in the surface scanned.

As a way of example, this work proposes the use of multiset analysis on the series of Raman hyperspectral images acquired during a thermal induced transformation of carbamazepine as the optimal way to extract useful information about polymorphic or any other kind of dynamic transformation among process compounds. Image multiset analysis, performed by using Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares (MCR-ALS), will furnish pure spectra and distribution maps of the compounds involved in the process and, hence, will allow the identification of polymorphs and, more important, the description of the process evolution at a global and local (pixel) level. Thus, process will be defined from a spatial point of view and by means of a set of global process profiles dependent on the process control variable. The results obtained confirm the power of this methodology and show the crucial role of the spatial information contained in the image (absent in conventional spectroscopy) for a correct process description.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polymorphism designs the existence of several crystalline forms for the same chemical compound. The differences in crystal structure induce variations in chemical and physical properties and, as a consequence, in the general behavior of the molecule. Polymorphism is often encountered in pharmaceutical compounds

* Corresponding author. Tel.: +34 676634744.

E-mail address: piqueras.sara@gmail.com (S. Piqueras).

and it is of utmost importance to ensure and control the synthesis of the pharmaceutically active form of the drug and to study the potential presence of polymorph transformations induced by different agents, such as light exposure, pressure or temperature changes [1,2]. This kind of transformations, when existing, may have complex and unknown mechanisms, being affected by variables, such as the structure of the product, imperfections within the crystal structure and sample history [3,4]. Process monitoring and identification of possible reactions on crystalline pharmaceutical materials can be carried out by on-line spectroscopic techniques for real time measurement of polymorph transformations [5].

Vibrational spectroscopic techniques such as NIR [6–8], MIR, FT-ATR [8,9] and Raman [8,10,11] are used for polymorph analysis. NIR and MIR are widely recognized as valuable tools in pharmaceutical analysis for raw material testing, quality control and process monitoring, mainly due to the little sample preparation required, high speed and ability to predict chemical properties combined with the suitable chemometric techniques. Nevertheless, applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical products are extremely diverse and spectral Raman features are more distinct and show generally less overlap than those in MIR and, specially, in NIR spectra. Solid-state Raman spectroscopy has been found to be more sensitive to changes in crystallinity and polymorphism [12,13].

Hyperspectral images are a kind of instrumental spectroscopic measurement, the use of which has grown significantly during the last decade. The main advantage of hyperspectral images compared with classical spectroscopy (NIR, MIR, ATR-IR or Raman) is that they combine spatial and spectral information about the sample. It has been proven that hyperspectral images are very powerful analytical tools with a highly innovative potential for applications linked to the development, manufacturing and quality control of pharmaceutical products [14–19]. Besides, hyperspectral images can be easily acquired while transformations take place without needing to act on the sample imaged [20–23]. Within the different imaging possibilities, Raman hyperspectral images are particularly suitable to study polymorphic transformations, since Raman features present relevant differences among polymorphs and the spatial character of images allows detecting polymorphs that can show up in different areas of the sample surface. Raman imaging enables to describe the evolution of the compounds in a process at a global and local pixel level; at the same time, the spatial information present in the images allows distinguishing compounds that can present the same process evolution, but different spatial distribution in the image. Thus, the appropriate treatment of hyperspectral images may furnish an accurate description of the solid-state transformation of polymorphs in the surface scanned (in terms of product identity and transformation dynamics).

From the data analysis point of view, unraveling the mixed spectroscopic contributions contained in a series of images obtained during a polymorphic transformation is a suitable problem to be solved with multivariate resolution (or image unmixing) techniques. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is an iterative resolution technique that allows recovering pure spectra and concentrations profiles (or distribution maps in images) of species involved in a monitored process [24–26]. MCR-ALS has been proven to adapt particularly well to hyperspectral image analysis due to the ease of introduction of external spectral and spatial information about the image and to the ability to work with single and multiset image structures. Multiset structures are formed by one data matrix (image) on top of each other which present common spectral mode. Multiset analysis allows treating simultaneously all images collected during the process [27–32].

To drive the MCR-ALS algorithm to a final meaningful and accurate solution, constraints are used to introduce information about distribution maps and pure spectra during the optimization process. In image resolution, constraints are generally limited to non-negativity and the spatial/compositional information is generally not applied. Local rank analysis methods have been adapted to describe the local spatial complexity of an image. Local rank information can be obtained from Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis (FSIW-EFA) [33]. FSIW-EFA is a local rank analysis method designed to take into account the spatial structure of images and to provide information on the compound overlap in the different regions of the sample surface imaged. In addition to this exploratory value, when the local rank information is combined with reference spectral information, the identification of absent image constituents in pixels with low species overlap can be carried out [34]. If needed, this information can be encoded as a local rank constraint with the consequent improvement of the description of the recovered maps and pure spectra due to the decrease of rotational ambiguity linked to the final solutions.

The novelty and main goal of this work is showing the potential of image multiset analysis by MCR-ALS to analyze a series of images collected during the development of a process, in this case, a drug polymorphic transformation. The direct MCR-ALS results are distribution maps and pure spectra of the constituents involved in the process. From the resolved pure spectra, identification of the polymorphic forms can be achieved. The process evolution is described by distribution maps, which furnish information at global and local (pixel) levels. How to use local rank information to have preliminary knowledge about the process, how to derive global and local process profiles and which are the advantages of monitoring a polymorphic transformation by imaging instead of using classical spectroscopic measurements will be shown through the study of a thermal-induced polymorphic transformation of carbamazepine monitored by Raman imaging.

2. Image sample and image acquisition

The sample analyzed has been anhydrous commercial carbamazepine (CBZ) obtained from Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ r.a. It was stored in airtight containers at 8°C .

Sample preparation consisted of compacting carbamazepine powder to obtain a flat surface before acquiring the images which presented 2 mm thickness. No other sample treatments were performed. Nine Raman images were collected along the thermal degradation at different temperatures (from $T = 25^\circ\text{C}$ to $T = 160^\circ\text{C}$). Labram HR confocal Raman micro-spectrometer manufactured by Horiba Jobin Yvon (Kyoto, Japan) was used in this work. A laser at 632.81 nm was used as light source and the Raman spectra were recorded with a 0.5 s acquisition time in the spectral range going from 100 to 1650 cm^{-1} . The acquisition time for whole image was 40 min.

Raman hyperspectral images have been acquired by point mapping with a pixel resolution of $10\text{ }\mu\text{m}$. The image size was $20 \times 20 \times 1349$, being the first two figures number of pixels in the x - and y - directions and the third number of spectral channels. A THMS600 from Linkam company was used as temperature-controller accessory with 0.1°C accuracy to keep constant this parameter during the image acquisition and an XY-motorized and computer controlled stage was used to ensure the appropriate systematic movement over the sample in order to obtain the Raman images. The different images were acquired after a 10-min stabilization period at each particular temperature without moving the sample from the XY stage to ensure that they were collected always on the same sample surface area. In this way, analogous pixels in different images refer always to the same sample position.

3. Data analysis

3.1. Image preprocessing

Raman pixel spectra have been first checked to detect the presence of cosmic peaks, the values of which were replaced by averaging Raman intensities of normal neighbouring pixels. Irregular and intense baselines in spectra due to the fluorescence contribution were corrected using the Asymmetric Least Squares (AsLS) algorithm proposed by Eilers [35,36]. AsLS is based on a recursive local fitting of the whole spectrum with a baseline obtained by using a Whittaker smoother. The Whittaker smoother can be described as a special case of B-spline smoothing, in which the number of knots is equal to the number of data points [37]. In each iterative cycle of the AsLS approach, the spectral channels that provided positive residuals in the previous iteration i.e., those channels where there is an absorption band, are downweighted in the baseline fitting operation. After a small number of fitting cycles, no more variation occurs and the fitted baseline obtained is used to correct the spectrum. Two parameters are tuned according to the shape of the baseline, one linked to the smoothness (λ) of the fit and one to the penalty imposed to the points giving positive residuals in the fit (p) [35,36]. The use of AsLS requires a significant difference in frequencies among the spectral features and the baseline to be removed. This is the case among the narrow Raman features and the broader fluorescent baseline contribution. This algorithm has proven to be successful in previous studies devoted to analyze Raman and FT-IR hyperspectral images [29,38].

3.2. Image exploratory analysis. Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis (FSIW-EFA)

Exploratory local rank analysis on images can provide information on the local complexity (compound overlap) of the sample analyzed. To obtain this knowledge, FSIW-EFA (Fixed-Size image Window-Evolving Factor Analysis) performs PCA analyses by moving small windows around each individual pixel area across the full image [33]. Each window is formed by a particular pixel and all its neighbors in the two dimensions of the image (see Fig. 1a). The results of these systematic local rank analyses can be displayed in singular value maps, which preserve the original surface structure of the image (see Fig. 1b). Large singular values in the n th singular value map for certain pixels indicate the presence of n overlapped compounds in these pixel areas. Setting a threshold to define the significance of singular values, local rank maps can be derived by plotting the number of significant singular values above this threshold for each pixel area.

FSIW-EFA analysis provides complete and partial local rank maps (see Fig. 1c and d). Complete local rank maps provide a rank value per each pixel and are obtained using a single threshold value. This plot displays the spatial complexity of the full image, i.e., how many constituents overlap in each pixel area. Partial local rank maps are derived using a threshold band instead of a threshold value. The threshold band marks the lowest and highest boundaries for sensible threshold values. Partial local rank maps only show rank values for pixels with invariant rank all along the threshold band, i.e., display only the pixels having the same rank value taking as a reference the highest and the lowest boundary of the threshold band. This kind of plot provides a partial view of the complexity of the image and is only used to select potential pixels onto which local rank constraints may be applied [34].

Because of the local character of the method, FSIW-EFA is particularly suitable for the detection of compounds with low signal or located in small zones of images and has also provided relevant information on sample heterogeneity [27].

3.3. Hyperspectral image resolution

3.3.1. Concept and data structures

The aim of hyperspectral image resolution methods is to provide distribution maps and pure spectra related to image constituents of a sample from the sole information contained in the raw image. An image data set can be visualized as a data cube (3D) of spectral readings where two dimensions design pixel coordinates (x and y) and the third spectral channels [19]. However, hyperspectral images follow a bilinear model, since the spectrum of any pixel is described by the concentration-weighted sum of the contributions of the pure spectra of the image constituents. Therefore, hyperspectral image resolution requires unfolding the data cube into an image data matrix (D), where the rows contain the pixel spectra one under the other. The D matrix follows the Beer–Lambert law and can be decomposed into a bilinear model formed by concentration profiles (C) and pure spectra (S^T) of image constituents, as expressed in Eq. (1):

$$D = CS^T + E \quad (1)$$

where E stands for the error matrix. By folding back each column of the C matrix to recover the original two-dimensional (2-D) configuration of the sample surface, the distribution map of each particular image constituent can be obtained [27–31].

Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is an iterative resolution method oriented to recover the

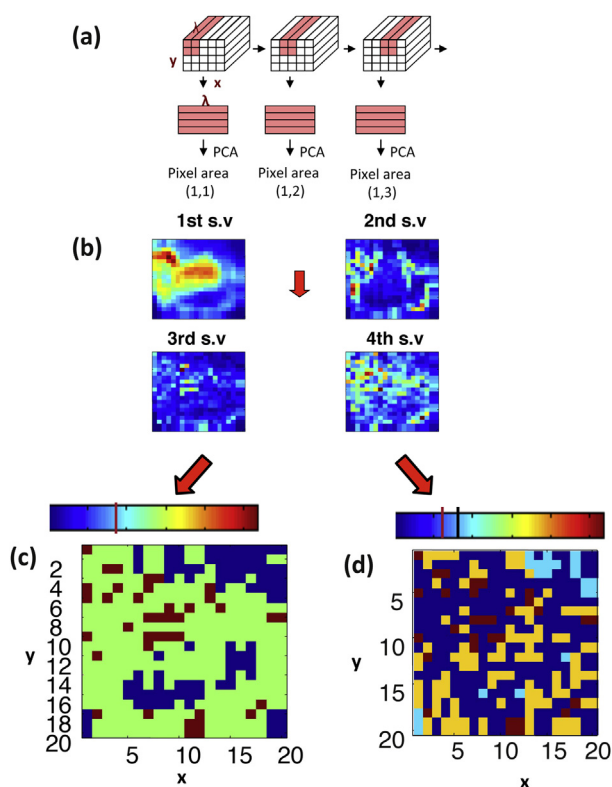


Fig. 1. Scheme of FSIW-EFA algorithm. (a) Construction of pixel windows; (b) singular value plots of local PCA analyses; (c) complete local rank map; (d) partial local rank map an image multiset.

underlying spectroscopic bilinear model in Eq. (1) through the following basic steps [24–27]:

1. Determination of the number of constituents in the raw image (D) (e.g., by SVD).
2. Generation of initial estimates (S^T) based on the selection of the purest pixel spectra, e.g. by a method based on SIMPLISMA [39].
3. Alternating calculation of S^T and C under constraints until proper reproduction of D and convergence in the optimization process is achieved.

Initial estimates are often generated by methods based on the selection of purest variables, such as SIMPLISMA (Simple-to-use Interactive Self-Modelling Mixture Analysis) or related methods. These methods find the most dissimilar spectra in the image analyzed. The alternating least-squares step 3 involves the operations $C = DS(S^T S)^{-1}$ and $S^T = (C^T C)^{-1} C^T D$, respectively. The end of the iterative process takes place when the product of the resolved concentration profiles and spectra reproduce the original data D without significant variation between the results of consecutive cycles. The parameter used to measure the fit quality of the MCR model is the lack of fit, $\text{lof}(\%)$, defined as follows:

$$\text{lof}(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{i,j}^2}{\sum_{i,j} d_{i,j}^2}} \quad (2)$$

where d_{ij} is the element of the original data matrix in row i and column j and e_{ij} is the residual obtained from the difference between the element d_{ij} of the original data set and the analogous element obtained from the MCR-ALS model.

When process monitoring is carried out by imaging techniques, the simultaneous analysis of all recorded images is mandatory to obtain a complete and reliable description of the process under study. In this case, multiset structures are built that contain different submatrices D_i , linked to each of the individual images acquired during the process, arranged one on top of each other. The

decomposition of a data multiset structure also obeys the bilinear model based on Beer–Lambert law (see Eq. (1)) and provides a single S^T matrix that contains the pure spectra of the constituents involved in the process, valid for all images analyzed, and a C matrix formed by as many submatrices C_i as individual images analyzed. Every column of a C_i submatrix can be refolded conveniently to obtain the distribution maps of the related D_i image (see Fig. 2).

3.3.2. Constraints and ambiguity

MCR-ALS allows introducing previous knowledge about images by the use of constraints on C and S^T profiles. The use of constraints in the resolution process helps to decrease rotation ambiguity effects in the final results obtained [10,40]. The most common constraint used in hyperspectral image analysis is non-negativity in concentration profiles and spectra [10,29,41]. Normalization of pure spectra in S^T is also a common constraint used to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization. Local rank constraints have been adapted to image analysis. To do so, the information contained in partial local rank maps (see Section 3.2) is confronted with reference spectral information coming from SIMPLISMA or from previous MCR analyses. This allows the identification of absent compounds in low rank pixels and this information is afterwards encoded to be used actively as a local rank constraint. For more details on the implementation and use of this constraint, see reference [34].

Although image resolution analysis often provides unique solutions by using only non-negativity constraints because of the large compositional diversity among pixels, the application of local rank constraints in image analysis is the best strategy to decrease or suppress remaining rotational ambiguity in particularly complex scenarios.

MCR-ALS for image multiset analysis follows the same steps mentioned above for single image analysis, but benefits from the complementary information contained in the different images to enhance the quality and precision of the final results. When needed, the C_i submatrices related to different images can be constrained

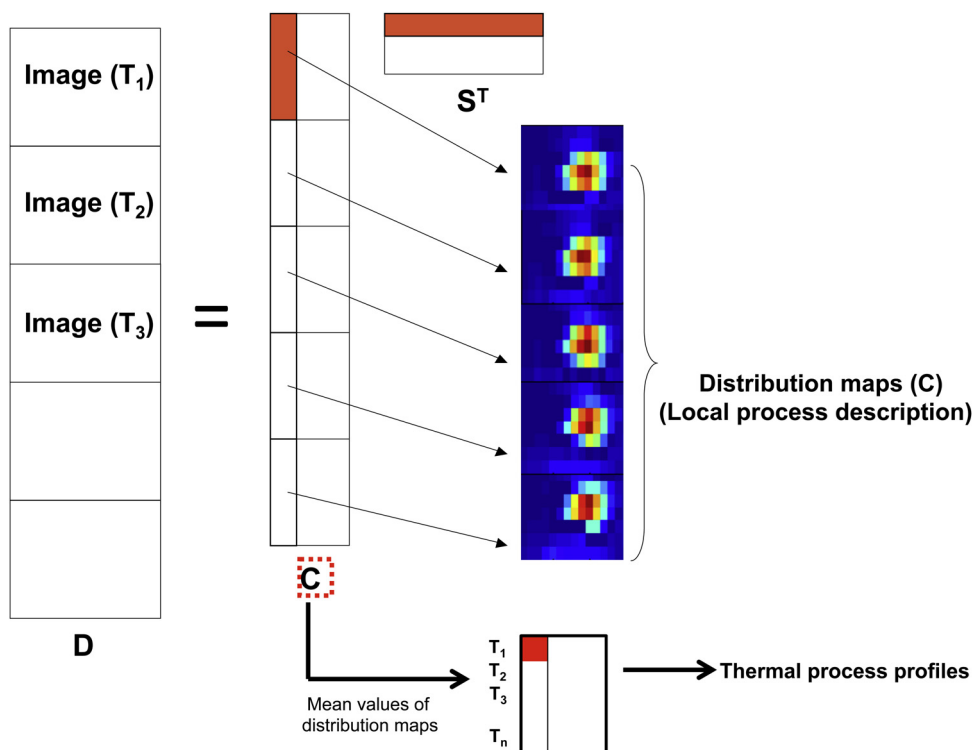


Fig. 2. Bilinear model for an image multiset.

differently. A specific constraint for multiset analysis is the correspondence among species, which encodes information on the presence/absence of constituents in the different full images. When the pattern of presence/absence of constituents is suitable and very different among images, this constraint suppresses the rotational ambiguity of the final resolution results [42]. In the case of unknown processes, no much prior information is usually available about the evolution of the system but, at least, it is clear which are the initial constituents (present) at the beginning of the process.

Once the resolution analysis is finished, checking for the presence and extent of ambiguity linked to the resolved profiles is a feasible task. To do so, we have adopted the method proposed by Tauler [43]. For each particular compound, this method provides the two dyads of concentration profile (distribution map) and related pure spectrum linked to the minimum and maximum signal that can be assigned to the compound analyzed in such a way that the total MCR solution obeys all the constraints set during the MCR analysis and reproduce the original data set with the optimal fit (see more algorithmic details in Ref. [43]). When there is uniqueness, the minimum and maximum boundaries for all compounds collapse into the same solution.

3.3.3. Global and local pixel process profiles based on MCR-ALS

The straightforward results of applying MCR to an image multiset coming from process monitoring are pure spectra and distribution maps of the species involved in the process. Pure spectra enable the characterization of compounds resulting from the

process and distribution maps display the process spatial evolution and offer the possibility to derive process profiles at a global and a local (pixel) level. When the images of the monitored process are obtained on the same sample area, process profiles can be defined at global and at pixel level:

- Global process profiles:** These profiles are obtained by plotting the mean values of the distribution maps of each constituent versus the process temperature
- Local (pixel) process profiles:** These profiles are only meaningful when analogous pixels in images represent the same sample area. Local (pixel) process profiles are obtained representing the concentration value of a particular pixel in the distribution maps versus the temperature (or process control variable). When images from a process monitoring are scanned on different areas, local (pixel) process profiles cannot be obtained because analogous pixels in different images do not represent the same sample area. However, global process profiles can still be obtained as long as the sample area scanned in the different images is representative of the composition of the whole chemical system, i.e., all compounds involved in the process must be present in the scanned areas. A possible procedure is described below:
- Global process profiles from images obtained on different scanned sample areas:** Assuming the presence of all process compounds in the different images, one could think that global process profiles could be built plotting the average of the mean values of the distribution maps versus the process control variable. The

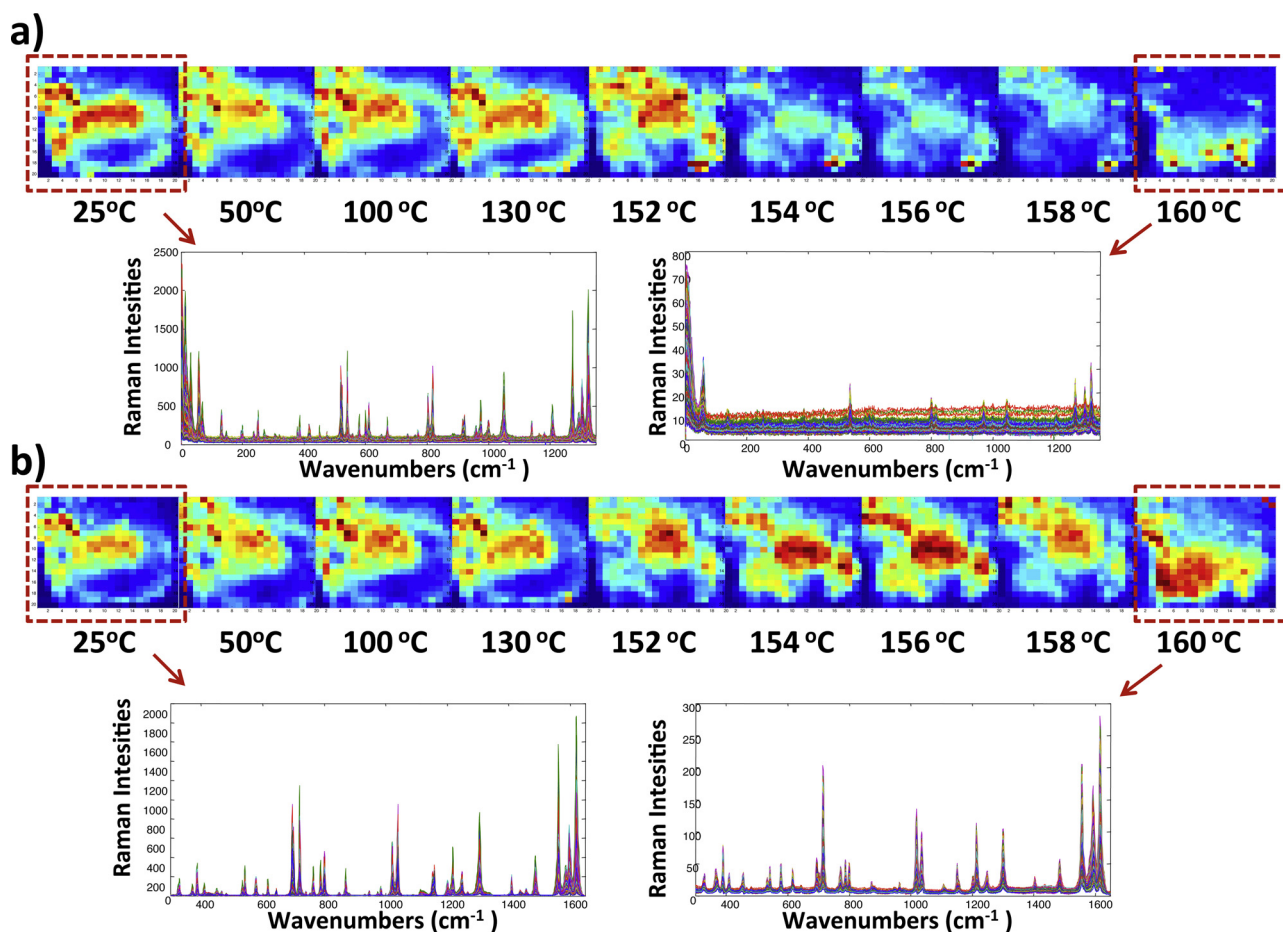


Fig. 3. (a) Raw global intensity maps of thermal-induced transformation of carbamazepine (top plot). Raw spectra of carbamazepine images at 25 °C and 160 °C (bottom plot). (b) Global intensity maps of thermal-induced transformation of carbamazepine after spectra AsLS correction (top plot). AsLS corrected spectra of carbamazepine images at 25 °C and 160 °C (bottom plot).

risk in this case would be that fluctuations in the process profiles could be not linked to process variations but to the different composition of the sample surface scanned in the different images. To alleviate this problem, we propose obtaining the process profiles by plotting the mean of the most intense concentration values for each constituent in the different distribution maps versus the process control variable, e.g. the 10% most intense pixel concentration values of the distribution maps of each image collected along the process (other percentages could also be tried).

3.4. Software

All data treatment has been performed with in-house made MATLAB routines. Asymmetric Least Squares baseline correction and application of the FSIW-EFA algorithm have been performed with routines available on request to the authors. MCR-ALS analysis and the estimation of rotational ambiguity in the resolved profiles has been done with GUI interfaces freely downloadable at: www.mcrals.info [25,44].

4. Results and discussion

4.1. Image preprocessing

Fig. 3a shows the raw global intensity maps of the collected carbamazepine images at different temperatures and the raw spectra of images recorded at 25 and 160 °C. Raw spectra of the first and last image of thermal degradation display intense background contributions due to fluorescence, which yields irregular and intense baselines, particularly at high temperatures. Narrow and intense 'needles', called cosmic peaks, also appear randomly located in Raman spectra. These phenomena hinder the treatment and correct interpretation of data sets. Therefore, baseline and cosmic peaks were removed according to the procedures described in Section 3.1. Fig. 3b shows the global intensity maps and spectra after the suitable preprocessing. After baseline correction, the spectral

range between 100 and 283 cm^{-1} was removed for further analysis because of the high variability in the raw measurement and the lack of relevant information in this spectral range.

4.2. Exploratory analysis/Fixed Size Image Window-Evolving Factor Analysis (FSIW-EFA)

First of all, Singular Value Decomposition (SVD) was applied to the multiset of images recorded at the different temperatures to know the total number of species involved in the thermal process. SVD indicated the presence of three components along the global process.

After this global analysis, FSIW-EFA was applied to each image collected along the thermal-induced polymorphic transformation of carbamazepine to have a first insight on the local complexity (compound overlap) of the process at the different stages. The global SVD analysis helped to set the size of the image windows to 2×2 , since the total number of components on the process was estimated to be three. The size of the window chosen should always be a compromise between having the necessary number of pixels to detect all situations of rank overlap (max. three compounds in this case) and the minimum possible size, to obtain local rank with maps with higher spatial resolution.

Fig. 4a shows the 2D singular value plots of the carbamazepine image at 25 °C, at the beginning of the process. Large values (red) represent singular values linked to significant contributions to the signal, while small values (blue) associate with singular values related to experimental noise. The singular value plots of carbamazepine at 25 °C indicated the presence of regions with two overlapping components in the image, since large values can be observed in several pixel areas in the 2nd singular value plot. In this case, FSIW-EFA allowed detecting the simultaneous presence of areas with two overlapping polymorphs at the beginning of the thermal monitoring process, which was unexpected.

Fig. 4b shows the FSIW-EFA local rank maps for each of the images collected along the process. Observation of all local rank

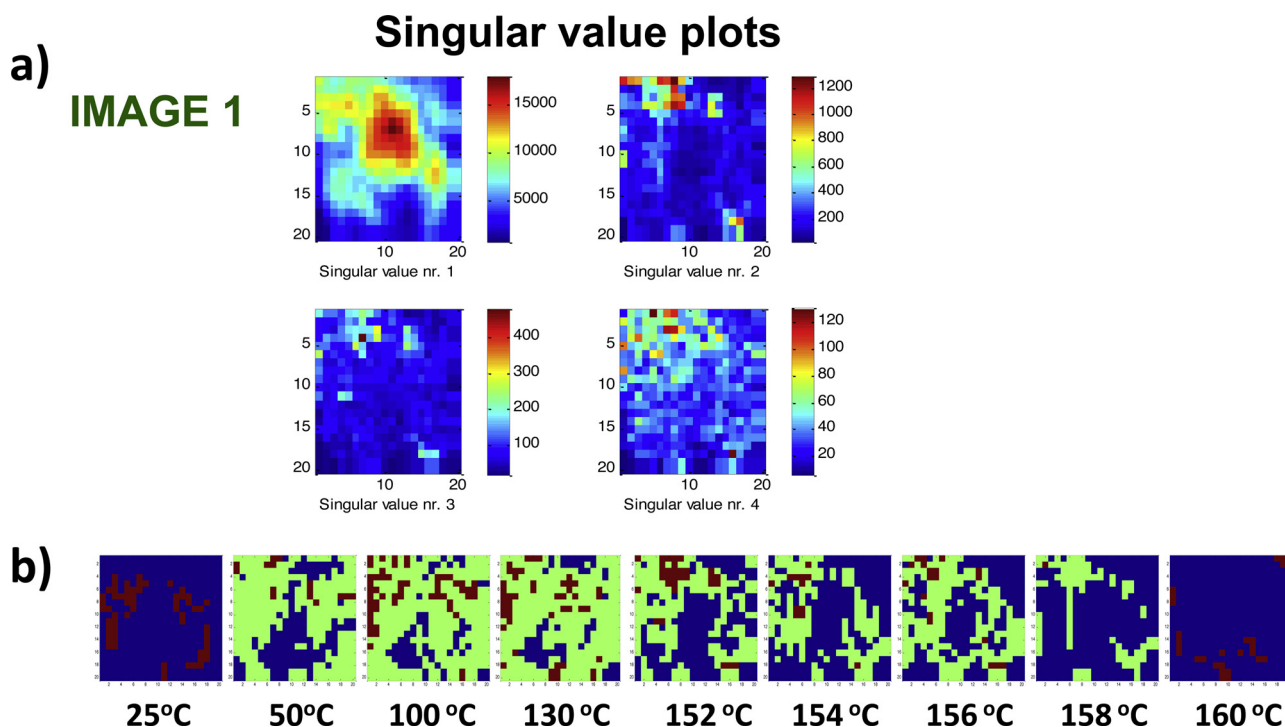


Fig. 4. FSIW-EFA results. (a) Singular value plots of carbamazepine image at 25 °C. (b) Local rank maps of carbamazepine images at the different process temperatures.

maps related to the process provides information about the variation of local pixel complexity as a function of temperature. In the local rank maps displayed, blue, red and green zones mean pixel areas with a single compound, two or three compounds overlapping, respectively. From 50 °C to 130 °C, the complexity of the process is larger with many image areas with two and three compound overlap. Since then, compound overlap and, therefore, image complexity decreases until the last image, at $T = 160$ °C, where only some pixel areas with two-compound overlap seem to show up.

In this work, FSIW-EFA has proven the presence of two polymorphic forms at the beginning of the process and has shown that zones with varied compound overlap exist in the rest of images. Having pixels in the image where the number of overlapping constituents is smaller than the total (i.e., where some constituents are absent) is crucial to obtain unique solutions in the image multiset resolution analysis [42].

4.3. Modelling of carbamazepine polymorphic transformation

4.3.1. MCR-ALS results

After FSIW-EFA exploratory analysis, MCR-ALS was carried out on the multiset structure formed by all the images collected along the thermal degradation of carbamazepine at the different temperatures (25, 50, 100, 130, 152, 154, 156, 158, 160 °C). Therefore, the multiset contained nine images and was structured as a column-wise augmented data matrix, since the spectral direction is common to all images (see Fig. 2).

As mentioned before, SVD analysis on the complete image multiset indicated the presence of three species in the polymorphic

process, whereas FSIW-EFA detected the presence of two polymorphic structures in the beginning of the process. This information will be used in the resolution process.

To speed up the construction of S^T initial estimates, SIMPLISMA was applied to a representative image pixel subset, where spectra from all images collected at the different process temperatures were included (one out of four chosen alternately). MCR-ALS analysis was then performed in the nine images multiset applying non-negativity constraints in concentrations profiles and spectra and spectra normalization. The constraint of correspondence among species was used since the presence/absence of constituents on the first image was known, i.e., only two initial forms existed and the product of the transformation was absent. The final MCR-ALS model had a lack of fit equal to 9%. This figure is satisfactory considering the noise level of the data and indicates that the constraints introduced in the resolution process were naturally fulfilled by the system.

Often, MCR-ALS solutions suffer from rotation ambiguity, i.e., in an image analysis context, this would mean that different sets of distribution maps and spectra would describe equally well the raw images analyzed. The presence of ambiguity in the solutions obtained was checked using the method proposed by Tauler [43], which is based on the calculation of the extent of rotation ambiguity associated with each component profile under the constraints applied during MCR-ALS analysis and providing an optimal fit. To do so, the graphical interface MCR-bands program, freely available at the web page: www.mcrals.info, was used [44]. This analysis indicated that resolved profiles obtained by MCR-ALS on the analysis of the image multiset investigated in this work had no associated

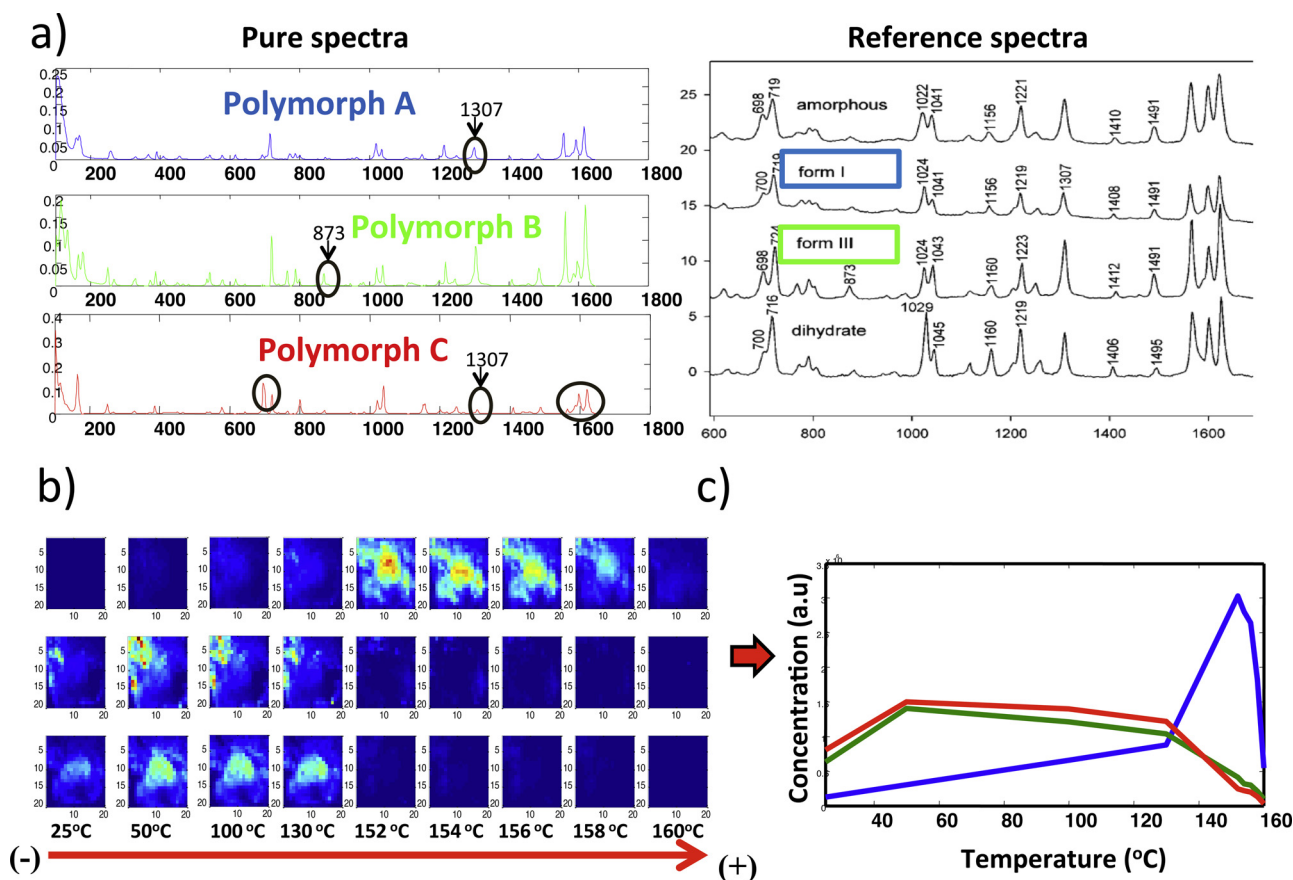


Fig. 5. MCR-ALS image multiset results. (a) Left plot: MCR resolved spectra of the species involved in the carbamazepine polymorphic transformation; right plot: reference spectra of carbamazepine polymorphs, adapted from [48]. (b) Distributions maps of species involved in the thermal-induced carbamazepine polymorphic transformation. Representation of global thermal profiles of the species involved in the process.

rotation ambiguity, and that MCR-ALS resolved distributions maps and pure spectra were reliable. This is not an exceptional case in image analysis, due to the often high compositional diversity of the many pixels in an image that does not allow having other possible linear combinations of the profiles describing the distribution maps and pure spectra of the components present in the image with optimal fit. The uniqueness achieved matches also the findings related to FSIW-EFA analysis, which showed the presence of zones with local rank smaller than the total number of compounds, an important fact to attain uniqueness in the resolution results. In case that the solutions obtained had not been unique, local rank constraints would have been applied in a second MCR analysis to suppress or decrease as much as possible the uncertainty in the results obtained. MCR-ALS resolved distribution maps and spectra are shown in Fig. 5.

4.3.2. Interpretation of modeling results: polymorph characterization and thermal-dependent transformation pathway

Fig. 5a shows the resolved pure spectra S^T of the three contributions modeled in the process and the reference spectra for the four well-characterized anhydrous and one hydrate polymorphs have been reported in the literature. The characterization of the chemical components was carried out comparing the pure spectra resolved with the spectra of the carbamazepine forms described in the literature [45–47]. All anhydrous solid-state forms reveal characteristic peaks; with different intensities around 1000–1100 and 1550–1600 cm^{-1} which represent complex C–C and C–N vibrations. In this region, modes involve the aromatic rings and symmetrical unsaturated C=C band vibrations due to carbamazepine molecular structure. Characteristic peaks occur at

873 cm^{-1} for form III and a less intensity band at 1307 cm^{-1} for form I [48]. Carbamazepine form III and form I are the two main enantiotropic polymorphs (denominated beta and alpha forms, respectively, in some literature references [48,49]. Form III is the commercial polymorph mainly used in tablets and it is the most stable form at low temperature, whereas form I has been reported to exist at higher temperatures. According to the literature and to the spectral features found in the resolved MCR-ALS spectra, A is identified as polymorph I (needle crystals) and B as polymorph III (prismatic crystals). C has not been yet identified, but it is a clear distinct polymorph form, as can be seen through different spectral features from the previous polymorphs, e.g., the very low peak at 1307 cm^{-1} and the different intensity pattern of features around 1550–1600 cm^{-1} or 700 cm^{-1} .

Fig. 5b shows the distribution maps of the three contributions (A, B and C) present in the thermal-induced polymorphic transformation. Distribution maps allow following the process evolution at a pixel (local) level and interpret spatial process evolution. We can see how component A emerges and B and C decay as temperature increases along the process. Finally, all compounds melt at the end of the process with the consequent decrease in Raman signal and loss of intensity in the distribution maps related to the last temperature ($T=160^\circ\text{C}$). Due to the heterogeneity of the sample, different dominant spatial zones for initial compounds B and C can be seen with a certain overlap between them. It is also clear that the polymorphic product A extends on the spatial areas of B and C and, therefore, it can be concluded that the single final product can be obtained from the two initial ones, following a scheme of the kind $B \rightarrow A$ and $C \rightarrow A$. These observations clearly proof the advantage of hyperspectral image monitoring versus classical spectroscopy.

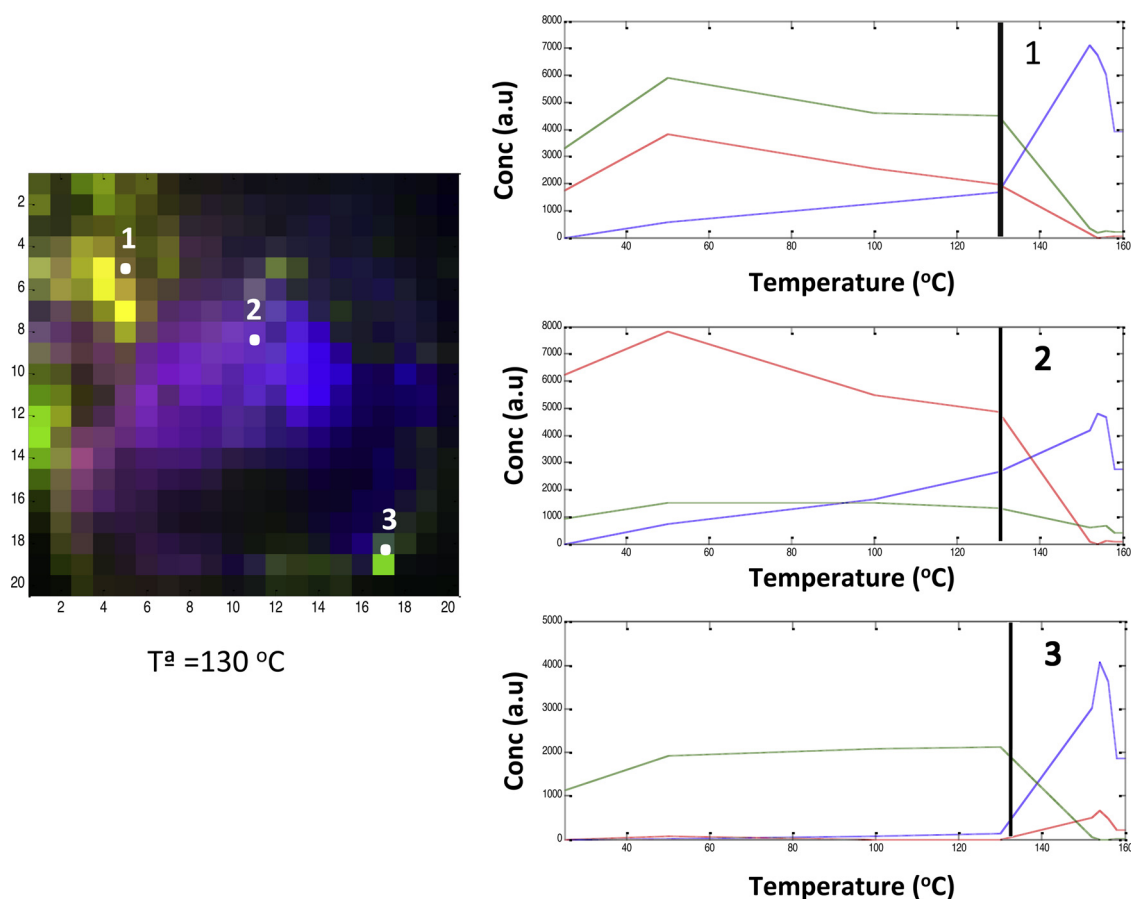


Fig. 6. False RGB image overlapping the three distributions maps of carbamazepine polymorphic transformation at 130 $^\circ\text{C}$ (left plot). Representation of thermal process profiles related to individual pixels 1, 2 and 3.

In the case of using Raman classical spectroscopy, only one initial polymorphic form would have been detected or, at the most, a single contribution made of a mixture of the two initial ones, because of the small localized sample area analyzed. This partial view of the

process would have also prevented suggesting any kind of parallel reactional (transformation dynamics) scheme.

Global thermal-dependent process profiles can be obtained by plotting the mean values of the distribution maps of each

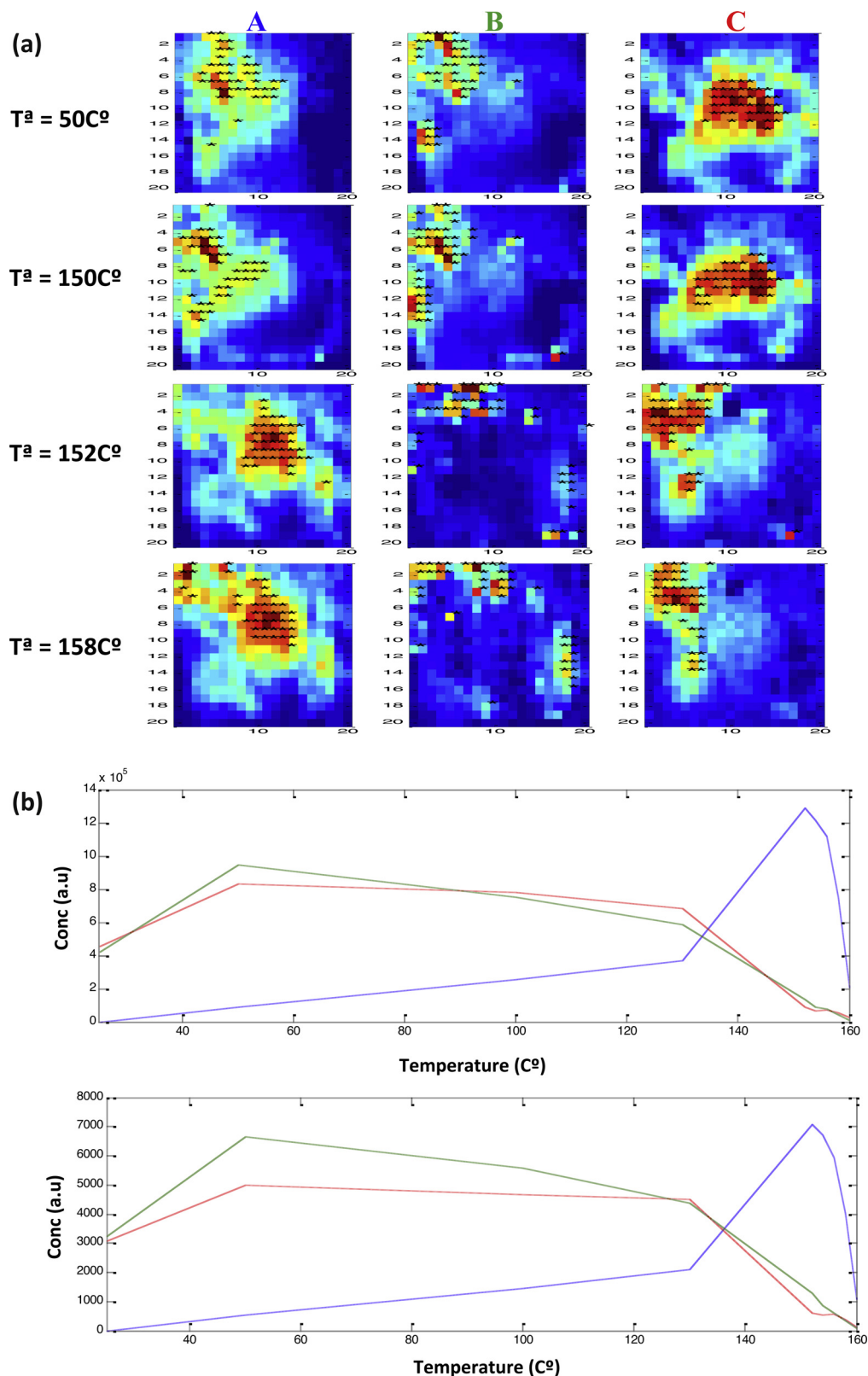


Fig. 7. (a) Distribution maps at 50, 150, 152 and 158 °C of each constituent (A, B and C). The 10% most intense pixels in each map are highlighted with black stars. (b) Global thermal profiles obtained from the mean of distribution maps as a function of temperature (top plot) and from the average of the 10% most intense values of distribution maps as a function of temperature (bottom plot).

constituent versus the process temperature (Fig. 5c). These global profiles provide information regarding the temperature dependence of the polymorphic transformation. The profiles obtained are in agreement with the hypothesis that polymorph III (labeled B in Fig. 5b) turns into polymorph I (labeled A in Fig. 5b) at high temperatures, as it has been reported in the literature [49,50]. It is important to note that B and C thermal profiles present a practically identical thermal evolution towards compound A, but differences in the spatial distribution and spectral signature of these two initial compounds confirm the presence of the two thermal transitions postulated above. B and C would not be distinguished if bulk spectroscopic measurements had been used. Again, it must be stressed the usefulness of the spatial information in hyperspectral images that allowed to model a parallel polymorphic transformation ($B \rightarrow A$ and $C \rightarrow A$), which would have never been detected if a single spectrum was collected at each stage of the process because of rank-deficiency problems [51]. In this case, the different spatial distribution pattern of the compounds B and C helped to distinguish the two parallel processes in this system.

It is also interesting to know how the process evolves at a local pixel level to find out whether there can be specificities unnoticed in global profiles or to explore a certain sample area or position of particular interest. As an example related to this process, Fig. 6 shows a false RGB image that overlaps the three distribution maps of carbamazepine polymorphic forms at $T = 130^\circ\text{C}$ (left plot). In this case, red, green and blue colors represent C, B and A forms, respectively. In the RGB image, 1, 2 and 3 show pixel positions where different species are dominant. Thus, pixel 1 in greyish color is an example where the three contributions are mixed at $T = 130^\circ\text{C}$, pixel 2 in purple shows a dominance of species C (red) and A (blue) at $T = 130^\circ\text{C}$ and a major impact of transition $C \rightarrow A$ and pixel three (in green) reveals a location where only polymorph B is present at $T = 130^\circ\text{C}$ and so has been since the beginning of the process (in this pixel only transition $B \rightarrow A$ exists). The different behaviour among pixels allowed distinguishing between compound B and C and provided a good global process interpretation. Besides, the local process profiles inform on the heterogeneity of the sample and the consequent changes at local level in the process evolution.

Even though the process monitored in this work has been followed on the same sample surface, we present in Fig. 7 the global process profiles that are obtained when the procedure proposed for processes followed with images recorded in different sample surfaces is applied (see Section 3.3). Thus, for each particular process compound, we have averaged the 10% most intense pixel concentration values of the distribution maps of each image collected along the process Fig. 7a represents in black the selected pixels for each constituent in some distributions maps at certain temperatures. As can be seen, the most intense pixels may change among images throughout the thermal monitoring process, but these pixels will always be those that better represent the process evolution because the signal-to-noise ratio is more favourable. Besides, since images contain a large number of pixels, the average of a 10% of them (or other percentage, if suitable) is sufficiently representative of the global evolution of the sample under study.

Fig. 7b (top plot) shows the global thermal profiles of carbamazepine polymorphic transformation obtained using the full distribution maps (identical to those in Fig. 5b) and the global thermal profiles derived from the mean of the most intense concentration values in the maps (bottom plot). As can be seen, the process evolution displayed is extremely similar in both cases. This means that a good representation of the global evolution of a process can also be obtained when a set of images are recorded on different sample areas.

5. Conclusions

MCR-ALS multiset analysis on sets of hyperspectral images collected along a solid-state transformation process has proven to be an excellent methodology to provide a complete description of the process from a global, local and structural point of view. Local rank analysis by FSIW-EFA is an invaluable tool to provide a first insight on the complexity of the process and location of transformations in the sample surface. This information has always a good exploratory value and can be used to set local rank constraints when needed.

Process monitoring by images and multiset MCR-ALS analysis provides process profiles at a global (image) and local (pixel) level and is much more powerful in discriminating process compounds and behaviours than classical spectroscopy. The introduction of the spatial information enclosed in the image allows differentiating compounds that can present the same process behavior but different location (spatial distribution) in the image. This fact is clearly seen in the present work, where two initial carbamazepine polymorph forms evolve to a third showing the same thermal-dependent evolution.

Process profiles from image analysis do not only provide a global vision from the sample evolution but a local description when process trends associated with single pixels or selected pixel areas are plotted. This ability to zoom sample areas is relevant to find out specific trends that can be associated with particular areas of the sample or to reveal variability in the process evolution linked to the presence of different compound overlap, sample heterogeneity or other properties.

References

- [1] M. Fujiwara, Z.K. Nagy, J.W. Chew, R.D. Braatz, *Journal of Process Control* 15 (2005) 493–504.
- [2] S. Rohani, S. Horne, K. Murthy, *Organic Process Research & Development* 9 (2005) 858–872.
- [3] S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, J.G. Stowell, in: *Solid-State Chemistry of Drugs*, second ed., SSCI, West Lafayette, 1999.
- [4] S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, G. Stephenson, D.J.W. Grant, W.B. Gleason, *Chemistry of Materials* 6 (1994) 1148–1158.
- [5] J.C. Anda, X.Z. Wang, X. Lai, K.J. Roberts, *Journal of Process Control* 15 (2005) 785–797.
- [6] M. Blanco, D. Valdés, I. Llorente, M. Bayod, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (2005) 1336–1342.
- [7] C.M. McGovern, L.C.H. Ho, J.A. Zeithler, C.J. Strachan, K.C. Gordon, *Vibrational Spectroscopy* 41 (2006) 225–231.
- [8] S.A. Surwase, J.P. Boetker, D. Saville, B.J. Boyd, K.C. Gordon, L. Pettonen, C.J. Strachan, *Molecular Pharmaceutics* 10 (2013) 4472–4480.
- [9] Y. Hu, A. Erxleben, A.G. Ryder, P. McArdle, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 412–420.
- [10] C.J. Strachan, D. Pratiwi, K.C. Gordon, T. Rades, *Raman Spectroscopy* 35 (2004) 347–352.
- [11] D. Pratiwi, J.P. Fawcett, K.C. Gordon, T. Rades, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54 (2002) 337–341.
- [12] M. Savolainen, A. Heinz, C. Strachan, K.C. Gordon, J. Yirui, T. Rades, N. Sandler, *European Journal of Pharmaceutical* 30 (2007) 113–123.
- [13] K. Buckley, P. Matousek, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011) 645–655.
- [14] S.A. Schönrichler, L.K.H. Bittner, A.K.H. Weiss, U.J. Griesser, J.D. Pallua, C.W. Huck, *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics* 84 (2013) 616–625.
- [15] P. Geladi, H. Grahn, in: *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis*, Wiley, Chichester UK, 1996.
- [16] M.D. Schaeberle, H.R. Morris, J.F. Turner, P. Treado, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 175A–181A.
- [17] E.N. Lewis, J. Dubois, *American Laboratory* 40 (2008) 18.
- [18] M.B. Sinclair, D.M. Haaland, J.A. Timlin, H.D.T. Jones, *Applied Optics* 45 (2006) 3283–3291.
- [19] A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, L. Duponchel, R. Tauler, in: R. Salzer, H.W. Siesler (Eds.), *Chemometric Tools for Image Analysis in Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Wiley-VCH, 2009, pp. 65–106.
- [20] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, C. de la Pezuela, *Analyst* 123 (1998) 135R–150R.
- [21] G. Reich, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1109–1143.
- [22] J. Dubois, J.C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrai, E.N. Lewis, *Spectroscopy (Amsterdam)* 22 (2007) 40.

- [23] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 533–553.
- [24] R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30 (1995) 133–146.
- [25] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 76 (2005) 101–110.
- [26] A. de Juan, S.C. Rutan, M. Maeder, R. Tauler, MCR Chapters, in: D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), in: *Comprehensive Chemometrics*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2009, pp. 325–344, 249–257, 473–503.
- [27] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 70–79.
- [28] J. Cruz, M. Bautista, J.M. Amigo, M. Blanco, *Talanta* 80 (2009) 473–478.
- [29] S. Piqueras, L. Duponchel, R. Tauler, A. de Juan, *Analytica Chimica Acta* 705 (2011) 182–192.
- [30] S. Piqueras, J. Burger, R. Tauler, A. de Juan, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 117 (2012) 169.
- [31] L. Duponchel, W. Elmi-Rayaleh, C. Ruckebusch, J.P. Huvenne, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43 (2007) 2057–2067.
- [32] J.H. Wang, P.K. Hopke, T.M. Hanczewicz, S.L.L. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 476 (2003) 93–109.
- [33] A. De Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 77 (2005) 64–74.
- [34] A. De Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, R. Tauler, *Journal of Chemometrics* 22 (2008) 291–298.
- [35] P. Eilers, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 404–411.
- [36] P. Eilers, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3631–3636.
- [37] E.T. Whittaker, *Proceedings of the Edinburgh Mathematical Society* 41 (1923) 63.
- [38] S. Piqueras, L. Duponchel, M. Offroy, J. Frédéric, R. Tauler, A. De Juan, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 6303–6311.
- [39] W. Windig, J. Guilment, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1425–1432.
- [40] R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski, *Journal of Chemometrics* 9 (1995) 31–58.
- [41] A. de Juan, R. Tauler, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36 (2006) 163–176.
- [42] R. Manne, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 27 (1995) 89.
- [43] R. Tauler, *Journal of Chemometrics* 15 (2001) 627–646.
- [44] J. Jaumot, R. Tauler, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 103 (2010) 96–107.
- [45] A.L. Grzesiak, M. Lang, K. Kim, A.J. Matzger, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (2003) 2260–2271.
- [46] J. Dugué, R. Ceólin, J.C. Rouland, F. Lepage, *Pharmaceutica Acta Helveticae* 66 (1991) 307–310.
- [47] F.U. Krahn, J.B. Mielck, *Pharmaceutica Acta Helveticae* 62 (1987) 247–254.
- [48] A.D. Edwards, B.Y. Shekunov, R.T. Forbes, J.G. Grossmann, P. York, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (2011) 1106–1114.
- [49] T. Umeda, N. Ohnishi, T. Yokohama, K. Kuroda, T. Kuroda, E. Tatsumi, Y. Matsuda, *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 104 (1984) 786–792.
- [50] L.E. O'Brien, P. Timmins, A.C. Williams, P. York, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004) 335–340.
- [51] M. Amrhein, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 33 (1996) 17.

5.2.1. Discussió dels resultats

En aquesta secció es presenta una discussió general conjunta dels treballs complementària a la que es pot trobar en els articles. L'objectiu general del bloc d'articles és mostrar el potencial del mètode MCR-ALS per a l'anàlisi conjunta de diverses imatges adquirides amb la mateixa tècnica espectroscòpica. Els resultats obtinguts en l'anàlisi d'aquestes estructures multiconjunt permet descriure el sistema químic de forma completa. S'ha investigat la utilitat de l'anàlisi conjunta de diverses imatges per a: 1) l'estudi d'heterogeneïtat i l'anàlisi quantitativa dels constituents d'un conjunt de mostres, 2) la millora de la resolució espacial d'una imatge mitjançant la combinació de la informació d'imatges de baixa resolució espacial i 3) el seguiment d'un procés *in situ* mitjançant imatges hiperespectrals.

5.2.1.1. Resolució conjunta de diverses imatges pel mètode MCR-ALS.

L'anàlisi conjunta de diverses imatges mitjançant l'algoritme de resolució de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS) proporciona els mapes de distribució espacial i els espectres purs dels constituents de les imatges analitzades, tal i com s'ha esmentat en l'apartat 4.3.3. En aquesta secció s'exposa de manera general el procés d'aplicació de l'algoritme MCR-ALS per a estructures d'imatge multiconjunt adquirides amb una mateixa tècnica espectroscòpica sota diferents condicions experimentals.

Per començar es construeix l'estructura multiconjunt d'imatges. Les imatges es col·loquen una sota l'altra en forma matricial on només han de compartir la dimensió espectral (vegeu figura 4.4.1.1 de la secció 4.4.1). El model bilineal proporciona una única matriu d'espectres purs (\mathbf{S}^T) i una matriu augmentada \mathbf{C} amb tantes submatrius com imatges s'hagin tractat conjuntament. Abans de procedir a la resolució de la matriu de dades augmentades en la direcció de les columnes, les dades originals són corregides per tal d'eliminar el soroll de fons. En el primer article es va observar l'efecte de dispersió del senyal NIR degut al diferent gruix i propietats físiques de les partícules que formen les mescles farmacèutiques. En aquest cas, es va aplicar l'algoritme MSC (vegeu secció 4.2.1) de manera global en la matriu augmentada prenent com a referència l'espectre medià del conjunt de dades. Per altra banda, en la exploració de la segona

estructura multiconjunt, corresponent a les imatges d'IR mitjà d'alta i baixa resolució espacial d'una única cèl·lula HeLa, es va observar l'efecte de dispersió Mie, propi de moltes mostres biològiques. Pel que fa a l'últim conjunt de dades estudiat, corresponent a les imatges Raman de la degradació tèrmica de la carbamazepina, les dades presentaven una forta contribució al senyal deguda a l'efecte de fluorescència. Les contribucions de dispersió Mie i fluorescència dels dos darrers estudis van ser corregides mitjançant l'algoritme AsLS (vegeu secció 4.2.1.1 corresponent a l'apartat de correcció de línia de base pel mètode AsLS).

Un cop les dades van ser corregides, es van dur a terme els passos previs a la resolució MCR-ALS associats a la determinació del nombre d'espècies i l'elaboració de les estimacions inicials. El nombre d'espècies es va determinar mitjançant la representació gràfica dels valors singulars, excepte en l'estudi de les mescles de productes farmacèutiques, de les quals se'n tenia un coneixement previ. Les estimacions inicials dels espectres dels components es van elaborar mitjançant un procediment basat en el mètode SIMPLISMA (vegeu secció 4.3.1). A continuació es va dur a terme l'optimització del càlcul de la matriu de concentracions i espectres purs sota les restriccions de no negativitat en ambdós tipus de perfils i la normalització dels espectres de la matriu \mathbf{S}^T . Cal destacar que en l'anàlisi de les mescles de productes farmacèutics i en el seguiment del procés s'ha incorporat la restricció correspondència d'espècies com a restricció addicional. Aquesta restricció, que codifica la presència o absència de components en les diferents imatges, és d'especial interès ja que disminueix l'ambigüitat de la resolució i proporciona resultats de més qualitat. Cal destacar l'estudi d'ambigüitat rotacional en l'article 5.2 III mitjançant el mètode proposat per Tauler¹.

A continuació es presenten els resultats de la resolució conjunta de les tres estructures multiconjunt estudiades en aquest bloc. Els mapes de distribució aporten informació espacial i de concentració sobre la distribució dels components de la mostra. Per a cadascuna de les estructures multiconjunt també s'obté una única matriu d'espectres purs que proporciona informació estructural sobre els components purs presents en les imatges.

Resolució de les mescles de fàrmacs

En la figura 5.2.1.1.1 es mostren els mapes de distribució de les diferents mescles binàries i ternàries de l'àcid acetilsalicílic, midó i cafeïna junt amb els seus respectius espectres purs. Qualitativament, mitjançant l'observació dels mapes de distribució es pot explorar l'heterogeneïtat de cadascun dels constituents de les mescles. La concentració global dels constituents es pot comparar observant la coloració dominant dels mapes de distribució, on el color vermell indica major contribució del constituents i el color blau menor contribució. En el present exemple, la progressió del color dels mapes de distribució concorda amb la concentració relativa dels diferents constituents de la imatge (vegeu taula 1 de l'article relacionat). En estudis per imatge en què l'objectiu principal és l'anàlisi quantitativa, és aconsellable utilitzar replicats d'imatge i replicats de mostra. Els replicats d'imatge són conjunts d'imatges recollits sobre la mateixa àrea de mostra i donen informació sobre la reproductibilitat de la mesura. En canvi, els replicats de mostra són conjunts d'imatges adquirides en diferents àrees de la mateixa mostra global i s'utilitzen per a estudiar l'heterogeneïtat de la mostra. En aquest estudi, la similitud entre els mapes de distribució dels replicats d'imatge (11 i 11b, 13 i 13 b, 14 i 14b, 12b, 12c i 12d) indiquen una bona reproductivitat de la mesura. Les petites diferències entre ells poden ser degudes al reposicionament manual de la mostra a l'instrument. En canvi, les diferències entre els mapes de distribució dels replicats de mostra (12am, 12bm i 12cm) són degudes a l'heterogeneïtat natural de les mescles analitzades.

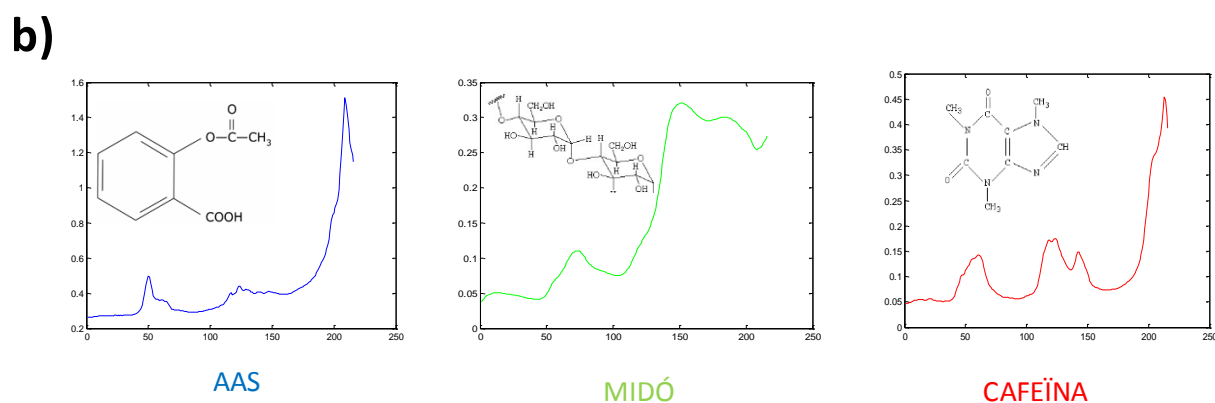
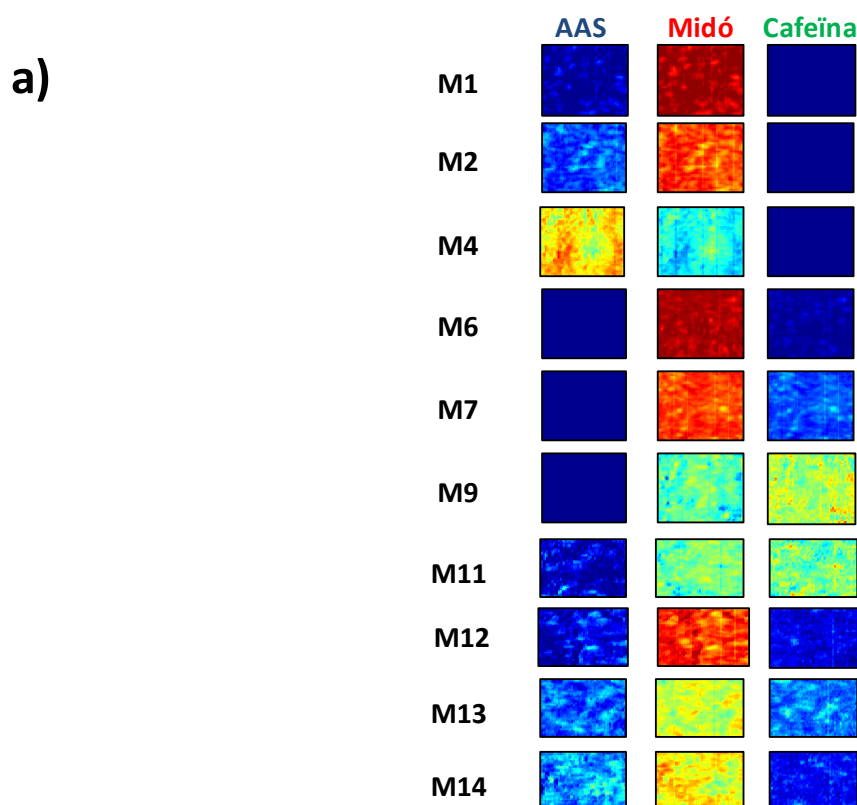


Figura 5.2.1.1.1. Resolució conjunta de diverses imatges NIR de mescles de productes farmacèutics.

a) Mapes de distribució i **b)** espectres purs de l'àcid acetilsalicílic (AAS), midó i cafeïna. En les mostres M11, M12, M13 i M14 es mostren només els mapes resoltos d'una imatge per brevetat.

Resolució de les imatges de baixa resolució espacial associades a una cèl·lula HeLa

En l'estudi de la millora de la descripció espacial d'una imatge de cèl·lula HeLa mitjançant l'ús d'imatges de baixa resolució espacial es disposava també d'una imatge d'alta resolució espacial de la mateixa cèl·lula HeLa, que va ser considerada com a imatge de referència. Primer es va dur

a terme l'anàlisi individual MCR-ALS per a la imatge de referència. La representació dels valors singulars va indicar la presència de tres contribucions cel·lulars. L'optimització de les matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T es va dur a terme a partir d'estimacions inicials espectrals purs sota les restriccions de no-negativitat en ambdós matrius \mathbf{C} i \mathbf{S}^T i la normalització de la matriu \mathbf{S}^T . Sota les mateixes restriccions es va dur a terme l'anàlisi conjunta per a la matriu augmentada en la direcció de les columnes formada per les 36 imatges de baixa resolució espacial desplaçades lleugerament entre elles. Per una banda, la figura 5.2.1.1.2a mostra els mapes resoltos de la imatge d'alta resolució espacial. Per altra banda, la figura 5.2.1.1.2b representa els 36 mapes de distribució de les imatges de baixa resolució espacial de la cèl·lula HeLa junt amb els espectres purs per a cadascun dels constituents de la cèl·lula. No es mostren els espectres purs de la imatge d'alta resolució espacial ja que són molt similars als espectres obtinguts en l'anàlisi conjunta, fenomen que indica que el conjunt d'imatges complementàries de baixa resolució espacial representa correctament la informació espectral rellevant dels constituents de la mostra analitzada.

Els mapes de distribució de la imatge de referència d'alta resolució espacial defineixen perfectament l'estructura del nucli, del citoplasma i de la membrana cel·lular i són caracteritzats mitjançant les signatures espectrals dels espectres purs associats. Els espectres a la regió de l'infraroig mitjà ($1800-800\text{ cm}^{-1}$) contenen les vibracions dels enllaços del grup ester a $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ relativa als lípids i les contribucions de les bandes amida I ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$) i amida II (1550 cm^{-1}), característiques de les proteïnes. En la regió $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ apareixen les bandes relacionades amb les cadenes proteiques, fosfolípids, sucres i bases dels àcids nucleics. Les signatures espectrals que s'observen en la regió $2900-3400\text{ cm}^{-1}$ provenen dels modes de vibració dels grups OH i NH tot i que la banda més predominant en aquesta regió és la vibració corresponen a l'amida A ($\sim 3350\text{ cm}^{-1}$). Es pot observar que les vibracions de les amides (CONH) relacionades amb les proteïnes contribueixen en tots els espectres purs (vegeu figura 5.2.1.1.2b) però majoritàriament predominen en l'espectre corresponent al nucli. Els espectres corresponents al citoplasma i la membrana cel·lular presenten contribucions de les bandes amida I i II, però sobretot presenten trets característics a longituds d'ones més altes on apareixen bandes més intenses conforme amb els components comuns d'aquests compartiments cel·lulars. A través de la visualització dels mapes de baixa resolució espacial es pot arribar a intuir la contribució de les tres parts cel·lulars, però és gràcies a la sòlida signatura espectral, comparable amb els espectres

purs associats als mapes de distribució d'elevada resolució espacial (vegeu article original) que poden ser clarament identificades.

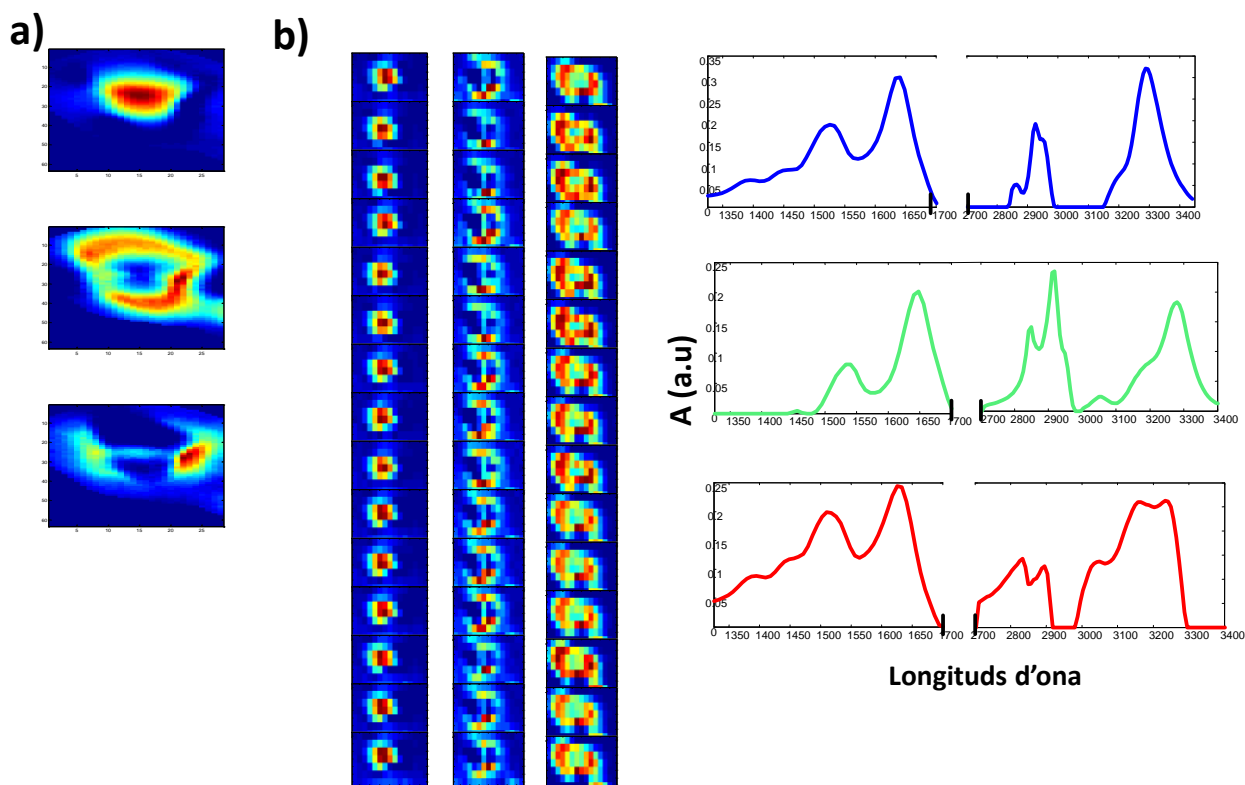


Figura 5.2.1.1.2 Resultats obtinguts de la resolució MCR-ALS. **a)** Mapes de distribució derivats de l'anàlisi individual de la imatge de la cèl·lula HeLa d'elevada resolució espacial. **b)** Mapes de distribució i espectres purs de la resolució conjunta de les 36 imatges de baixa resolució espacial de la cèl·lula HeLa.

Resolució de les imatges associades al seguiment de la transformació polimòrfica de la carbamazepina

L'última estructura multiconjunt analitzada proporciona informació que ajuda a entendre millor la transformació polimòrfica de la carbamazepina induïda per la temperatura, a escala global i local.

En aquest estudi, abans de dur a terme la resolució conjunta es va realitzar l'anàlisi exploratòria de les dades mitjançant l'algoritme FSIW-EFA en cadascuna de les imatges del procés per

examinar la complexitat i participació dels constituents en les diferents fases del procés. En la figura 5.2.1.1.3c es mostren els mapes de rang local procedents de l'anàlisi FSIW-EFA, realitzats amb una finestra de dimensió de 2x2 píxels (vegeu figura 5.2.1.1.3) ja que l'anàlisi de valors singulars sobre la imatge global va indicar la presència de tres constituents durant el procés. Els mapes de rang local van aportar informació sobre la variació de rang local a escala de píxel en funció de la temperatura, on el color verd indica la presència de tres constituents superposats en un píxel, el color vermell dos constituents i el blau un sol constituent. Sorprenentment, des d'un inici es va revelar la presència de dos components (imatge T= 25°C). Els mapes de rang local de les imatges entre 50°C i 130 °C presenten major complexitat, ja que en la majoria de zones els constituents es troben solapats. A partir de la imatge adquirida a 130 °C, la complexitat de la imatge disminueix gradualment. Els mapes de rang local proporcionen informació prèvia sobre l'evolució espacial del procés.

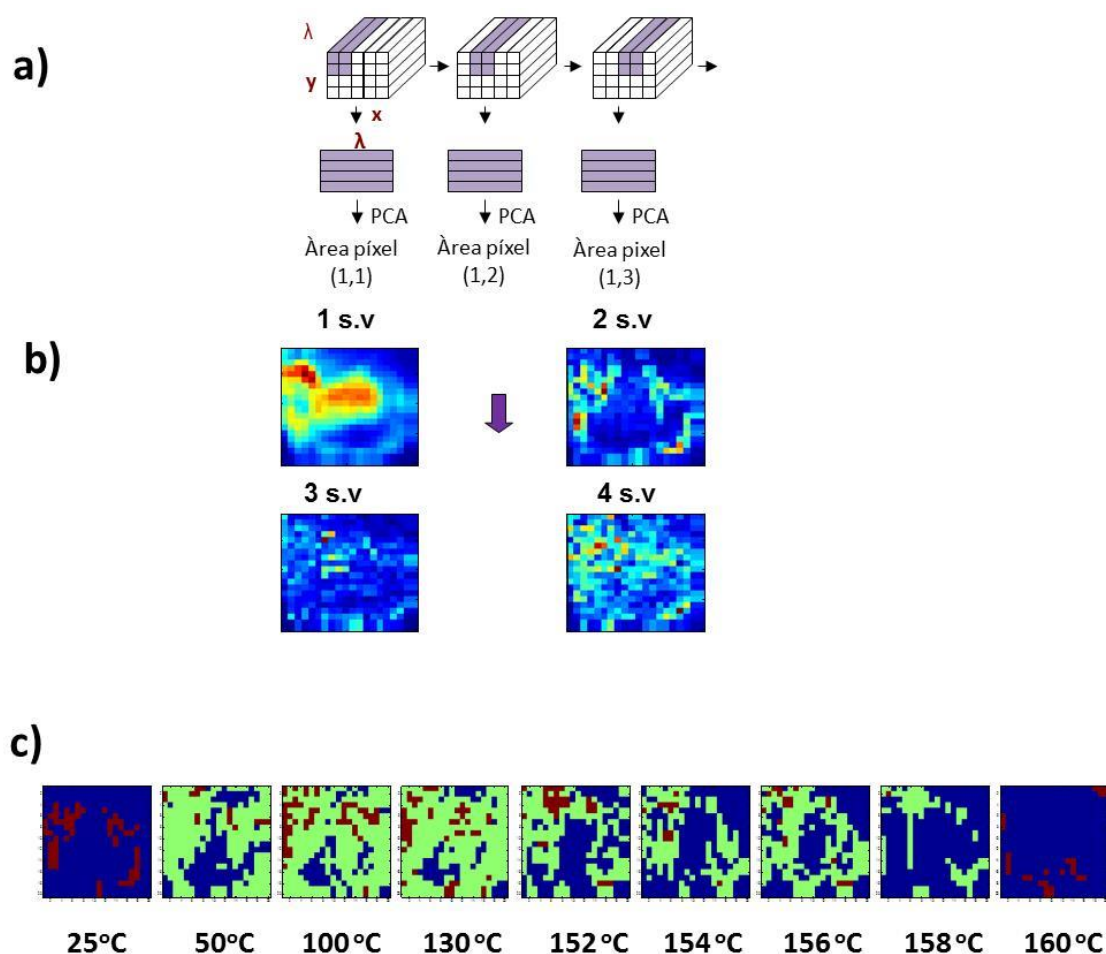


Figura 5.2.1.1.3 Esquema gràfic sobre l'anàlisi FSIW-EFA de les imatges obtingudes durant la degradació tèrmica de la carbamazepina. **a)** Representació del moviment de la finestra de dimensió 2x2 píxels a través de la superfície escanejada de la mostra. Estudi de l'anàlisi de PCA a cadascuna de les àrees de píxel. **b)** Exemple dels mapes dels quatre valors singulars de la primera imatge del procés. **c)** Mapes de rang local de cadascuna de les imatges obtingudes durant el procés en funció de la temperatura.

A continuació es va dur a terme l'anàlisi conjunta de les nou imatges mitjançant el mètode MCR-ALS. Es va aplicar la restricció de correspondència d'espècies ja que la informació de l'anàlisi exploratòria de rang local i una anàlisi de resolució prèvia només aplicant la restricció de no-negativitat evidencien l'absència de la forma polimòrfica del producte en la imatge inicial del procés i de les formes polimòrfiques dels reactius en l'última imatge del procés. En la figura 5.2.1.1.4 es mostren els mapes de distribució de les formes polimòrfiques implicades en el procés. A través de la visualització dels mapes de distribució s'examina l'evolució espacial del

procés. Tal i com ja s'havia intuït en l'anàlisi exploratòria, s'observa la presència de dues formes polimòrfiques des de l'inici del procés (B i C) que evolucionen amb la temperatura cap a la formació d'una nova estructura polimòrfica (A) (vegeu figura 5.2.1.1.4). Els mapes de distribució ens confirmen la presència de dues formes polimòrfiques inicials involucrades en el procés, ja que es troben distribuïdes en zones espacials del mapa diferents (formes B i C), que es transformen en un únic producte final (forma A).

Els mapes de distribució permeten descriure l'evolució espacial dels constituents involucrats en els processos. Per a tenir una visió global del procés, es poden representar els valors mitjans de concentració dels mapes de distribució resolts per a cada constituent en cada imatge en funció de la temperatura a la qual han estat adquirides les imatges. La figura 5.2.1.1.4 mostra aquesta representació on es poden observar els perfils de la degradació tèrmica per a cadascuna de les espècies del procés. S'observa que les formes polimòrfiques B i C presenten perfils de degradació molt similars. El perfils de degradació de les formes B i C apareixen des d'un inici i van decreixent a mesura que augmenta la temperatura. En canvi, el perfil de degradació de l'espècie polimòrfica A apareix a mesura que augmenta la temperatura. Les espècies B i C han estat diferenciades, tot i que presenten perfils tèrmics similars, gràcies a la diferent distribució espacial d'aquests constituents en les imatges adquirides. Cal destacar que les dues formes polimòrfiques B i C no haguessin estat detectades si el procés hagués estat seguit mitjançant espectroscòpia Raman clàssica, que recull un espectre puntual d'una zona específica de la mostra en cada punt del procés. En aquest mode de seguiment, una única contribució associada a l'evolució d'una espècie o d'una mescla de les dues hauria pogut ser modelada.

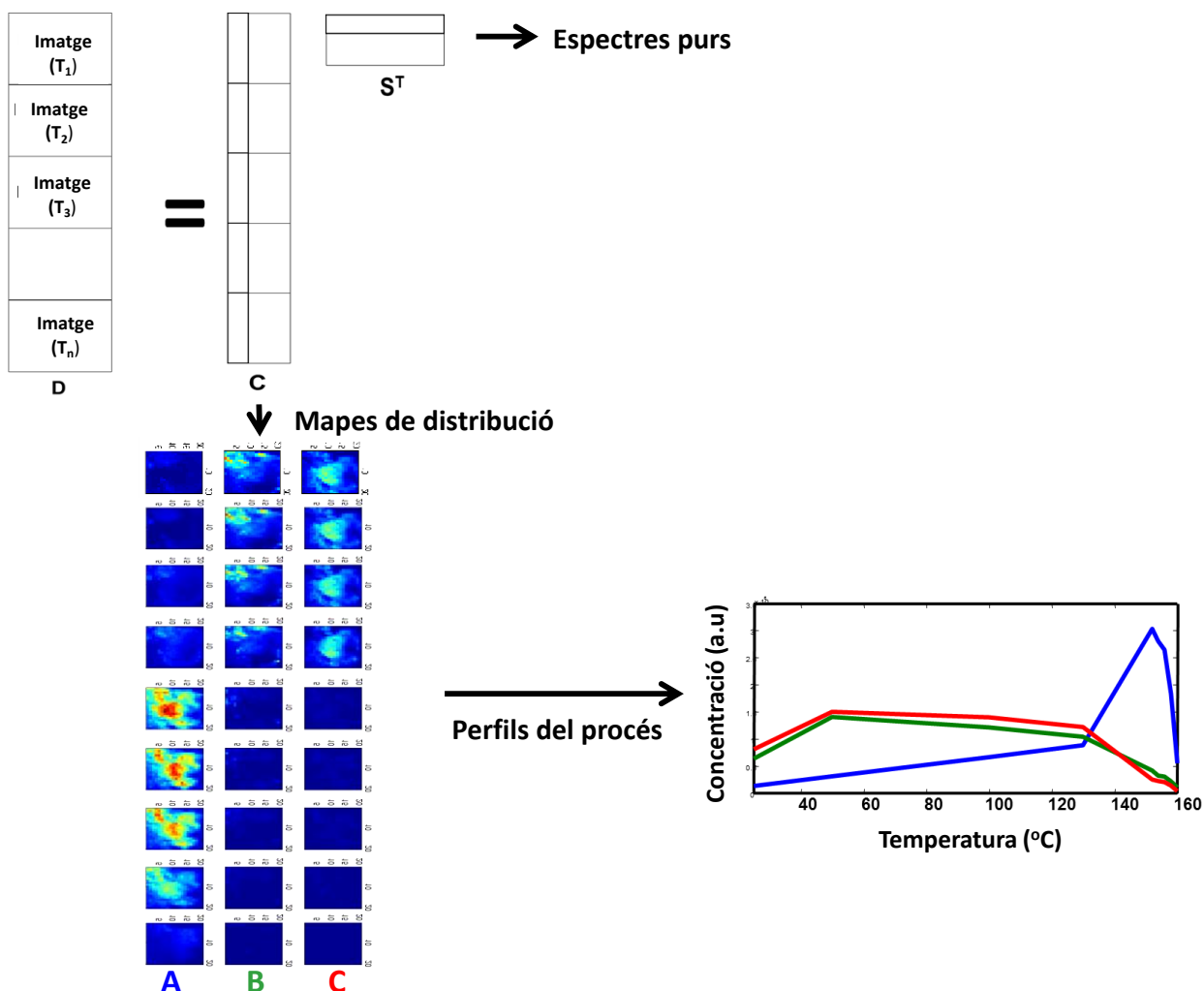


Figura 5.2.1.1.4 Representació del model bilineal MCR-ALS de la matriu augmentada en la direcció de les columnes relativa al seguiment del procés de degradació de la carbamazepina en funció de la temperatura. Mapes de distribució de les formes polimòrfiques A, B i C. Representació dels perfils globals tèrmics a partir de la mitjana dels mapes de distribució en funció de cada constituent de la imatge de la temperatura.

La interpretació del procés va continuar amb la identificació de les espècies a partir dels espectres purs resolts. No es va disposar d'una biblioteca d'espectres, però es van comparar els espectres obtinguts amb espectres de referència de quatre formes polimòrfiques de la carbamazepina, descrites en la bibliografia ²⁻⁴. A l'esquerra de la figura 5.2.1.1.5 es poden observar els espectres purs resolts i a la dreta els espectres de referència. Totes les formes polimòrfiques presenten bandes característiques entre $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ i $1550\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, corresponents a les vibracions C-C i C-N. En aquesta regió es troben implicats el modes de

vibració C=C a causa de l'estructura de la carbamazepina. La forma polimòrfica I té una estructura cristal·lina, on els cristalls tenen forma d'agulles, i és caracteritzada per la banda d'absorció a 873 cm^{-1} , en canvi la forma polimòrfica III també té una estructura cristal·lina, però els cristalls són de forma prismàtica i espectralment s'associa a la desaparició de la banda a 1307 cm^{-1} . La forma III és la forma polimòrfica emprada comercialment en els comprimits farmacèutics i és la forma més estable a baixes temperatures. Comparant la bibliografia amb les signatures espectrals resoltes mitjançant l'anàlisi MCR-ALS, la forma polimòrfica I correspon a l'espècie A i la forma polimòrfica III a l'espècie B. L'espècie C no ha estat possible d'identificar però es tracta clarament d'una forma polimòrfica diferent a les altres perquè existeixen diferències espectrals i una distribució espacial del compost associat diferent a la de la resta d'espècies presents.

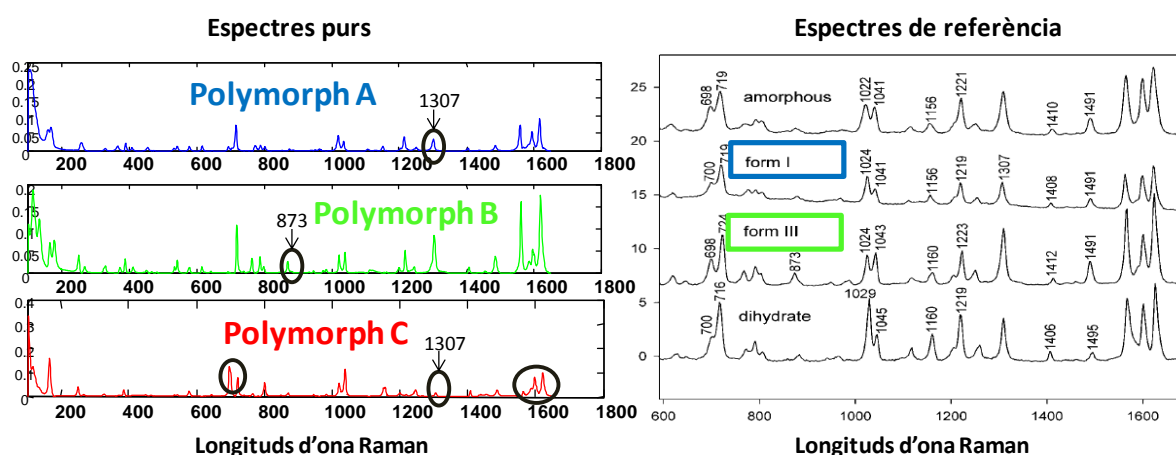


Figura 5.2.1.1.5 A l'esquerra els espectres purs de les formes polimòrfiques A, B i C resolts mitjançant l'anàlisi conjunta MCR-ALS. A la dreta els espectres de referència de les quatre formes polimòrfiques anhidres corresponents a la carbamazepina.

En molts casos no és possible o resulta difícil el seguiment dels processos mitjançant imatges adquirides exactament sobre la mateixa superfície de la mostra. Davant aquesta nova situació, es modifica l'estratègia lleugerament per a la interpretació correcta del procés. La resolució conjunta per MCR-ALS es duu a terme de la mateixa manera, ja que no és necessària la correspondència de píxels entre les imatges, només cal que les imatges comparteixin el mateix nombre de canals espectrals. La diferència resideix en la interpretació global del procés. En lloc

de tenir en compte tots els píxels dels mapes de distribució per a l'obtenció dels perfils del procés, es consideren un 10% dels valors de concentració de píxels més elevats, ja que les zones de la superfície de la mostra no són equivalents.

Es va comprovar la viabilitat de la nova estratègia utilitzant els mapes de distribució resolts anteriorment. En la figura 7a del article 5.2-III es mostren alguns dels mapes de distribució emprats en aquesta estratègia, on el 10% dels píxels que presenten valors de concentració més elevats es troben marcats en negre. En la mateixa figura es mostren els perfils globals obtinguts a partir de la mitjana del 10% dels valors de píxels seleccionats per a cadascuna de les formes polimòrfiques (vegeu figura 7b del article 5.2-III). Es pot observar que considerant el 10% dels píxels amb valors de concentració més alts no es perd informació rellevant sobre l'evolució del procés. Els perfils globals del procés són molt similars als perfils tèrmics obtinguts anteriorment usant la mitjana de tots els valors presents en els mapes de distribució (vegeu figura 5.2.1.1.4). De manera que el procediment de treball proposat és vàlid per al seguiment d'un procés mitjançant imatges adquirides en diferents zones de la superfície de la mostra.

A través de l'anàlisi de resolució conjunta MCR-ALS i de l'ús dels resultats s'ha descrit un procediment general de treball per a la interpretació dels processos. Fora de l'objectiu principal d'aquest estudi, però relacionat amb l'anàlisi de les imatges, en aquest mateix treball s'ha estudiat l'ambigüitat rotacional de les solucions. Com ja s'ha comentat en l'apartat 4.4, l'anàlisi MCR-ALS pot no presentar una solució única, és a dir, poden existir un conjunt de solucions possibles que poden descriure les dades originals.

L'ambigüitat de les solucions obtingudes en la resolució del procés va ser estudiada a partir del mètode proposat per Tauler ¹. El càlcul es va dur a terme a través de la interfície gràfica coneguda amb el nom *MCR-ALS bands* disponible en la pàgina web www.mcrals.info ⁵. L'anàlisi va indicar que no existia ambigüitat rotacional en l'anàlisi MCR-ALS quan s'usaven les restriccions de no-negativitat i correspondència d'espècies. Aquest fet no resulta ser un cas excepcional, atesa la gran diversitat composicional present quan es consideren els píxels que componen les imatges. És sovint difícil, per tant, que hi hagi més d'una combinació lineal que descrigui de manera òptima sota les mateixes restriccions els perfils per a cadascun dels components. A més a més, la restricció de correspondència d'espècies ajuda significativament a reduir l'ambigüitat rotacional i obtenir una solució única.

5.2.1.2 Postprocessat dels resultats de resolució

En l'apartat anterior s'ha mostrat la capacitat del mètode MCR-ALS per a la resolució conjunta d'imatges adquirides en diferents condicions experimentals amb la mateixa tècnica espectroscòpica. A continuació, es presenten els diferents postprocessats dissenyats en aquest bloc de treball, els quals s'han orientat a l'anàlisi quantitativa global i local (escala de píxel), estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional i millora de la descripció espacial d'una imatge.

5.2.1.2.1 Anàlisi quantitativa global i local (escala de píxels). Estudi de l'heterogeneïtat distribucional i constitucional.

Anàlisi quantitativa de constituents d'una imatge a escala global i local

La quantificació en imatges hiperespectrals s'ha dut a terme clàssicament amb mètodes de calibratge multivariant, com la regressió per mínims quadrats parcials (PLS)⁶⁻⁹. En el context de l'anàlisi d'imatges, aquesta àrea es coneix amb el nom de regressió multivariant d'imatges (MIR, *multivariate image regression*)¹⁰⁻¹². Tot i així, aquest treball proposa un nou procediment per a la quantificació absoluta dels constituents d'una imatge a partir de la informació continguda en els perfils de concentració procedents de la resolució conjunta MCR-ALS d'estructures multiconjunt i l'ús de valors de concentració global de referència d'imatges de mostres de calibratge.

Per a un constituent concret, el procediment es basa en la construcció d'un model de calibratge pseudounivariant que relaciona els valors mitjans dels mapes de distribució (\bar{C}_{ALS}) procedents de la resolució MCR-ALS amb els valors reals de la concentració del constituent en les imatges analitzades (%ref) tal i com s'expressa en l'equació 5.5.

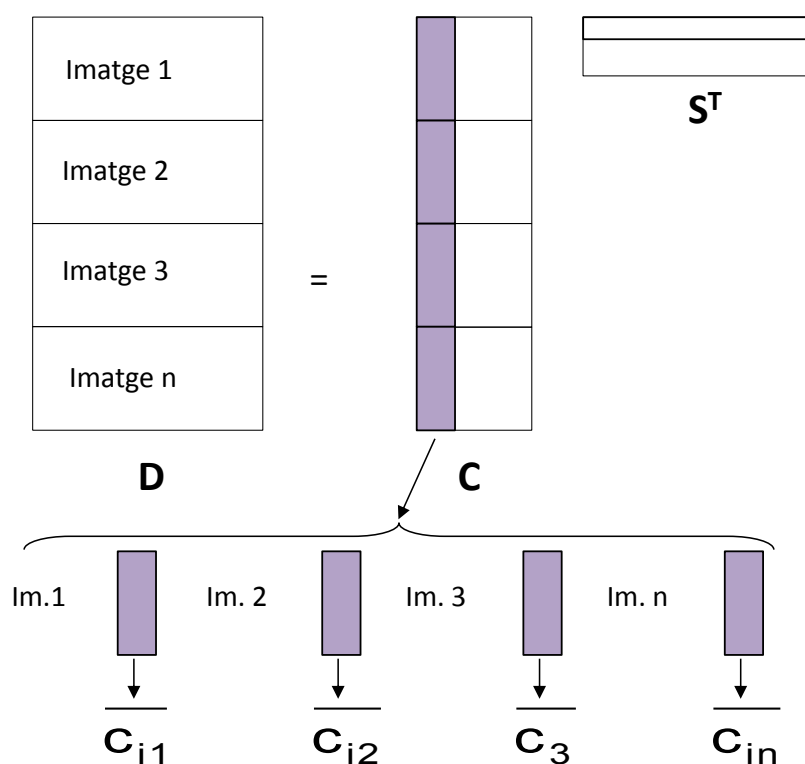
$$\bar{C}_{ALS} = a\%ref + b \quad \text{Equació 5.5}$$

La predicció de percentatge d'un constituent en una imatge desconeguda ($\hat{\%}_{pred}$) s'obté aplicant el model anterior.

$$\hat{\%}_{pred} = \frac{\bar{C}_{ALS} - b}{a} \quad \text{Equació 5.6}$$

La figura 5.2.1.2.1.1 mostra l'esquema gràfic per a l'anàlisi quantitativa, que fa ús dels valors mitjans dels perfils de concentració procedents de l'anàlisi conjunta MCR-ALS per a un dels constituents de les imatges del sistema .

La figura 5.2.1.2.1.1 mostra l'esquema gràfic per a l'anàlisi quantitativa, que fa ús dels valors mitjans dels perfils de concentració procedents de l'anàlisi conjunta MCR-ALS per a un dels constituents de les imatges del sistema .



5.2.1.2.1.1 Representació de l'obtenció d'informació quantitativa mitjançant el mètode MCR-ALS per a un conjunt d'imatges.

Per a avaluar la qualitat del model de calibratge que relaciona les concentracions proporcionades mitjançant MCR-ALS i les de referència, s'avaluen els paràmetres de la recta de regressió entre els valors predits pel model de calibratge (\hat{y}_{pred}) i els valors de referència (y_{ref}) en mostres conegudes. El paràmetre **RMSEC**, que és l'error mitjà associat a la predicció de les concentracions de les mostres utilitzades en el model de calibratge es defineix com es mostra a continuació:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{\%}pred_{(i)} - \%ref_{(i)})^2}{n}}$$

Equació 5.7

on n és el nombre de mostres (imatges) analitzades. En un model de calibratge ideal, $\hat{\%}pred = \%ref$. És a dir, $\hat{\%}pred = 1 \times \%ref + 0$. Quan el pendent de la recta és 1 i l'ordenada en l'origen és 0, no es produeixen sobreestimacions ni subestimacions de la concentració predita i no hi ha errors sistemàtics en el procediment de calibratge.

El procediment exposat es va aplicar a un conjunt d'imatges NIR de mescles sòlides de cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó de diferents composicions i proporcions (taula 1 de l'article 5.2-I). El model va proporcionar quantificacions satisfactòries, no hi va haver presència d'error sistemàtic en la predicció i el valor de RMSEC es va trobar entre el 4-8%, interval satisfactori si es té en compte la naturalesa de la mesura i l'heterogeneïtat de les mostres. L'anàlisi quantitativa a partir de la informació procedent dels perfils de concentració dóna una bona estimació de la concentració real dels constituents de la imatge.

La validació és una etapa necessària en qualsevol procediment de calibratge per a demostrar que els resultats que proporciona el model de calibratge són fiables i que el model pot ser utilitzat posteriorment per a la quantificació de mostres desconegudes. Com a contribució nova, es van proposar diferents metodologies de validació per a comprovar la veracitat de l'anàlisi quantitativa realitzada a partir de les concentracions obtingudes mitjançant el model de resolució MCR-ALS. Com el mètode que proporciona la informació quantitativa és un mètode de resolució i no un mètode de calibratge multivariant convencional, com el PLS, cal modificar el procediment de validació.

En el mètode MCR-ALS existeix una etapa de resolució prèvia a la construcció del model de calibratge, en què la informació sobre les concentracions de referència no s'utilitza. Un cop realitzada la resolució, és quan s'estableix el model de calibratge relacionant la informació procedent de l'anàlisi MCR-ALS amb la informació quantitativa de referència. Per tant, en la proposta de validació dels resultats quantitius obtinguts a partir d'informació procedent de

MCR-ALS, s'han tingut en compte diferents combinacions en l'etapa de resolució de l'estructura multiconjunt d'imatges i en la construcció del model de calibratge. S'han assajat les següents combinacions (vegeu figura 4 de l'article 5.2-I) :

Mètode A

- Resolució: s'utilitzen totes les imatges disponibles completes en l'estructura multiconjunt.
- Model de calibratge: es fa relacionant la mitjana dels perfils de concentració obtingut per MCR-ALS de la meitat dels píxels de cada imatge amb els valors de referència.
- Validació: s'utilitzen les mitjanes de les concentracions obtingudes per MCR-ALS de la meitat no utilitzada de cada imatge no utilitzada en el model de calibratge.

Mètode B

- Resolució: s'utilitzen la meitat dels píxels de totes les imatges disponibles per a construir l'estructura multiconjunt.
- Model de calibratge: es fa relacionant la mitjana dels perfils de concentració obtingut per MCR-ALS amb els valors de referència.
- Validació: els perfils de concentració associats a la meitat no utilitzada en la resolució de les imatges no utilitzats en resolució s'obtenen amb un pas únic de mínims quadrats entre la matriu de píxels que s'utilitza en validació ($\mathbf{D}_{\text{validació}}$) i la matriu d'espectres purs obtinguda per MCR-ALS (\mathbf{S}^T) sobre les imatges de calibratge.

$$\mathbf{C}_{\text{validació}} = \mathbf{D}_{\text{validació}} \mathbf{S}_{\text{calibratge}} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})_{\text{calibratge}}^{-1}$$

La predicció es fa sobre la mitjana dels perfils de concentració de cada imatge en $\mathbf{C}_{\text{validació}}$.

Mètode C

- Resolució: l'estructura multiconjunt es fa amb algunes de les imatges disponibles que passen a ser el conjunt de calibratge.
- Model de calibratge: relaciona la mitjana dels perfils de concentració obtingut per MCR-ALS amb els valors de referència.
- Validació: els perfils de concentració d'imatges externes de validació s'obtenen amb un pas únic de mínims quadrats entre les imatges no utilitzades ($\mathbf{D}_{\text{validació}}$) i la matriu d'espectres purs obtinguda per MCR-ALS ($\mathbf{S}_{\text{calibratge}}^T$).

$$\mathbf{C}_{\text{validació}} = \mathbf{D}_{\text{validació}} \mathbf{S}_{\text{calibratge}} (\mathbf{S}^T \mathbf{S})_{\text{calibratge}}$$

La predicció es fa sobre la mitjana dels perfils de concentracions de cada imatge en $\mathbf{C}_{\text{validació}}$.

Els resultats obtinguts amb els mètodes de validació A, B i C són similars i satisfactoris, ja que tant els paràmetres de la recta (pendents i ordenada a l'origen) com els coeficients de correlació són adequats (vegeu taula 5 de l'article 5.2-I). L'error de predicció també es manté en valors acceptables per al tipus de mesura analitzat. Tot i així, els mètodes de validació presenten diferències entre ells. Per exemple, en el mètode de validació A totes les dades són emprades durant l'etapa de resolució. En canvi, en els mètodes de validació B i C, només una part de les dades es veu implicada en el procés de resolució. En el mètode de validació B, la resolució s'ha realitzat amb la meitat de la informació de cadascuna de les imatges adquirides. Aquest fet presenta un doble interès: d'una banda en l'etapa de resolució els resultats obtinguts són de la mateixa qualitat que en emprar el conjunt total i el temps de càlcul es redueix dràsticament. El

mètode de validació B resulta atractiu perquè valida a la vegada el pas de resolució i el de construcció del model de calibratge. També les etapes de validació i resolució són validades en el mètode de validació C però, a diferència dels altres mètodes, aquest utilitza la meitat de les imatges en el pas de resolució i l'altra meitat en el pas de validació. Això resulta particularment interessant, ja que l'etapa de resolució, que és la més lenta del procés, es fa una sola vegada amb les mostres de calibratge. L'etapa de validació o de predicció de mostres desconegudes és molt ràpida, ja que només implica un pas de mínims quadrats per a l'obtenció dels perfils de concentració i l'ús posterior del model de calibratge per a la predicció de concentracions.

L'estratègia C sembla més adequada per a un context real en què es mesurin moltes imatges i calgui una quantificació ràpida. Caldrà, però, comprovar que el conjunt d'imatges del model de calibratge sigui prou nombrós i representatiu per a assegurar una qualitat suficient en els resultats obtinguts i, si és necessari, caldria actualitzar-ho perquè el model de calibratge no perdi validesa.

L'anàlisi quantitativa es pot dur a terme de forma global o per a cadascun dels píxels que constitueixen la imatge. L'anàlisi quantitativa local es basa en el càlcul del valor de concentració absolut per a cada píxel de la imatge. Per a aquesta finalitat, és suficient utilitzar el model de calibratge obtingut per a l'anàlisi quantitativa global (equació 5.5) i realitzar la predicció de concentració en cada píxel a partir del valor relacionat de concentració en el mapa resolt per MCR-ALS (equació 5.6). D'aquesta forma s'obtenen els mapes de distribució de concentracions reals per a cadascun dels constituents de la imatge (vegeu figura 5.2.1.2.1.2).

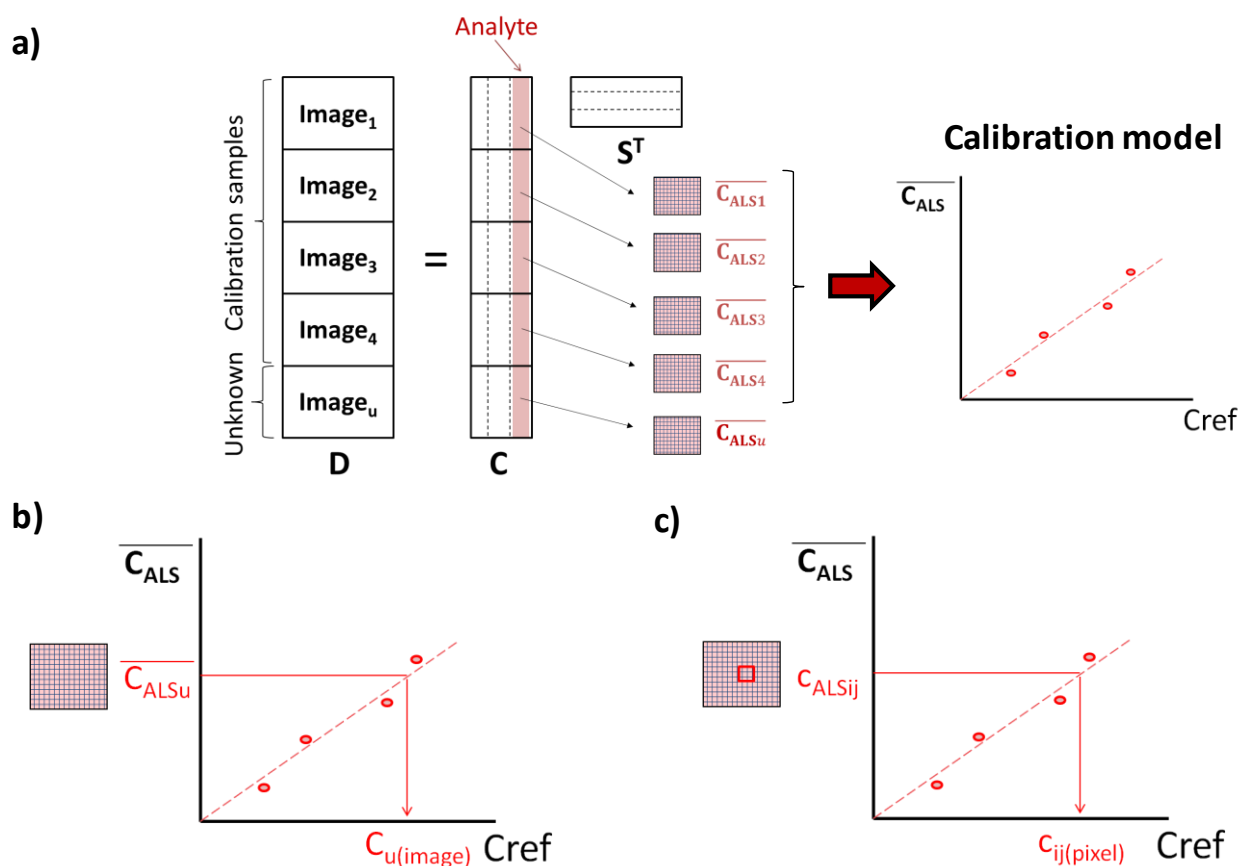


Figura 5.2.1.2.1.2 Representació de l'anàlisi quantitativa global i a escala de píxel en imatges **a)** Model de calibratge construït relacionant la mitjana dels perfils de concentració (o mapes de distribució) amb els valors de concentració de referència. **b)** Esquerra: predicció de concentració global en una imatge nova. Dreta: predicció local a escala de píxel.

Els mapes de distribució de concentracions reals resulten ser de gran utilitat també per a l'estudi d'heterogeneïtat de cadascun dels constituents de la imatge. Aquests estudis són de gran rellevància en la indústria farmacèutica on cal assegurar una distribució suficientment uniforme de tots els components del preparat farmacèutic^{13,14}. L'heterogeneïtat global d'una mostra conté les contribucions d'heterogeneïtat constitucional i distribucional. L'heterogeneïtat constitucional representa la diferència de composició química entre píxels individuals; en canvi, l'heterogeneïtat distribucional representa la diferència de composició química entre àrees de píxels veïns i es relaciona amb la distribució més o menys uniforme del material en la mostra¹⁵.

L'heterogeneïtat és una propietat que pot ser estudiada de manera qualitativa a partir de l'observació dels mapes de distribució resolts per MCR-ALS. No obstant això, en aquesta tesi

s'han volgut proporcionar indicadors quantitatius d'heterogeneïtat lligats a la composició i distribució dels constituents de la imatge a partir dels mapes de distribució de valors de concentracions reals.

L'heterogeneïtat constitucional es pot caracteritzar correctament mitjançant histogrames construïts a partir dels valors de concentració dels píxels d'una mapa de distribució. L'histograma i els seus paràmetres estadístics associats (mitjana, desviació estàndard...) són les eines més emprades per a l'estudi d'heterogeneïtat química d'una imatge hiperespectral ^{6,16}. L'amplada de l'histograma es troba relacionada amb el grau d'heterogeneïtat dels constituents en la imatge. És a dir, histogrames estrets indiquen que la majoria dels píxels tenen la mateixa concentració per a un constituent determinat; en canvi, histogrames amples indiquen superfícies de mostra constituïdes per píxels amb concentracions molt diverses.

D'altra banda, es va proposar la inspecció de l'heterogeneïtat distribucional mitjançant la representació de corbes d'heterogeneïtat per a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals. Les corbes d'heterogeneïtat representen la variància associada a canvis de concentració entre píxels en funció de la mida de l'àrea de píxels veïns estudiada. Per a tal fi, per a una mida d'àrea de píxels determinada (1 píxel individual, 2×2, 3×3...) es construeix una finestra que es mou fins a escanejar tota la superfície de la imatge. De cada àrea escanejada es calcula la mitjana de concentració (c_{ij}) i es compara amb la mitjana global del mapa (\bar{c}) mitjançant l'equació 5.8.

$$V_{(J)} = \frac{\sum_i (c_{ij} - \bar{c})^2}{n\bar{c}^2}$$

Equació 5.8

on n és el nombre d'àrees construïdes d'una mida particular. Així, per a cada mida d'àrea escanejada (J) s'obté un valor de variància mitjà ($V_{(J)}$). La corba d'heterogeneïtat s'obté representant els valors de variància $V_{(J)}$ en funció de la mida de l'àrea de píxels escanejada. El descens més o menys pronunciat de les corbes és l'indicador de l'heterogeneïtat distribucional de les espècies presents a cada mescla. Un descens pronunciat indica un grau d'heterogeneïtat menor que un descens menys pronunciat, ja que la composició local del constituent en un àrea de píxels petita ja s'assembla molt a la concentració mitjana global.

Les imatges NIR de les mescles de productes farmacèutics quantificades prèviament van ser emprades com a exemple per a mostrar els indicadors d'heterogeneïtat constitucional i distribucional. En la figura 5.2.1.2.1.3 s'observen els mapes de distribució de concentracions reals de l'àcid acetilsalicílic corresponents a les mescles 2 i 3, del midó corresponents a les mescles 3 i 4 i de la cafeïna corresponents a les mescles 7 i 9 (vegeu la taula 1 de l'article 5.2-I). Tal i com ja s'ha explicat, els histogrames dels constituents de les mescles es representen utilitzant els valors individuals de concentració en els píxels d'un mapa de distribució. Histogrames estrets, en aquest cas el histograma del midó procedent de la mescla 4, presenten un grau d'heterogeneïtat menor que els histogrames de major amplada, com l'histograma de la mateixa espècie corresponent a la mescla 3 (vegeu figura 5.2.1.2.1.3). En la mateixa figura 5.2.1.2.1.3 es troben representades les corbes d'heterogeneïtat. L'heterogeneïtat distribucional s'examina a través del descens més o menys pronunciat de les corbes. A través d'aquest indicador d'heterogeneïtat distribucional es pot deduir que el midó de la mescla 3 presenta una elevada heterogeneïtat distribucional, atès que el descens de la corba és menys pronunciat. Per contra, el mateix constituent present en la mescla 4 es troba distribuït menys heterogèniament ja que el descens de la corba és pronunciat. Aquest fenomen també ocorre si comparem les corbes de les mescles 2 i 3 de l'AAS. En aquest cas, les amplades dels histogrames (heterogeneïtat constitucional) són similars però la corba d'heterogeneïtat de la mostra 3 indica una heterogeneïtat distribucional molt més elevada que la pròpia de la mostra 2. Aquests resultats corroboren la importància d'estudiar els dos aspectes relacionats amb l'heterogeneïtat (composicional i distribucional) si es vol tenir una correcta caracterització de les mostres.

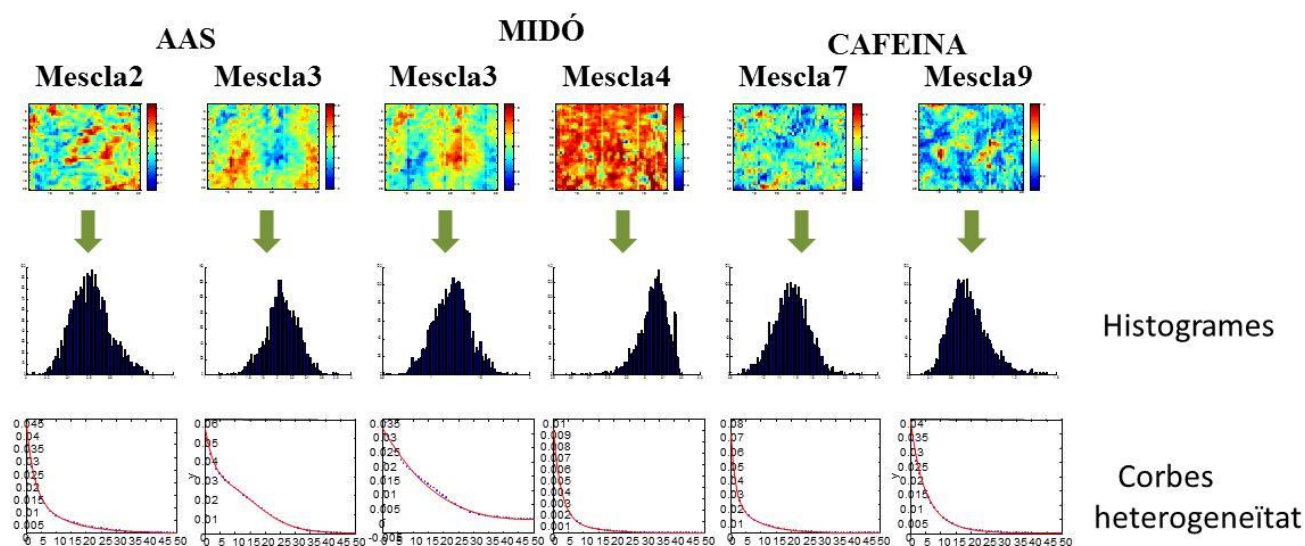


Figura 5.2.1.2.1.3 Estudi d'heterogeneïtat constitucional i distribucional de les imatges NIR de mescles d'AAS, midó i cafeïna. Representació dels histogrames, corbes d'heterogeneïtat.

5.2.1.2.2. Augment de la resolució espacial original de la imatge

L'ús de tècniques matemàtiques per a augmentar la resolució espacial de la imatge és un aspecte important en el tractament de la imatge hiperespectral, ja que permet superar el límit instrumental i s'obtenen imatges de major qualitat i definició ^{17,18}. Les tècniques de superresolució es basen en augmentar la resolució espacial d'una imatge per combinació de la informació procedent d'un conjunt d'imatges complementàries de baixa resolució espacial. El requisit de les imatges de baixa resolució és que han de ser enregistrades amb un desplaçament entre elles inferior a la mida de píxel real. Tal i com s'ha esmentat en la secció 4.6, l'algoritme de superresolució es va desenvolupar per a l'augment de la qualitat d'imatges adquirides en escala de gris, però posteriorment Duponchel et. al van proposar l'ús per a la millora de la resolució espacial en canals d'imatges multispectrals ¹⁹. No obstant això, l'algoritme de superresolució és lent i tediós de computar ja que les matrius implicades en el càlcul són de dimensions molt grans, tot i els diferents procediments de regularització aplicats per a la reducció de temps de computació de l'algoritme ²⁰. L'aplicació directa de l'algoritme a cadascun dels centenars o milers de canals d'una imatge hiperespectral és una solució impensable i que només proporcionaria com a resultat una imatge superresolta de grans dimensions que caldria analitzar mitjançant

altres mètodes per a obtenir informació útil. Atès el problema presentat, es va plantejar una estratègia per a la millora de la descripció espacial d'una imatge hiperspectral que segueix els passos següents:

- 1) Optimització del nombre d'imatges de baixa resolució necessari per a l'anàlisi de super-resolució. Les imatges adquirides han de presentar un desplaçament entre elles d'una mida igual o més petita que la mida final de píxel desitjada.
- 2) Resolució del nombre d'imatges de baixa resolució adquirides mitjançant l'anàlisi conjunta MCR-ALS d'una matriu augmentada en la direcció de les columnes.
- 3) Postprocessat de superresolució, utilitzant com a informació continguda en els mapes de distribució procedents de la resolució MCR-ALS realitzada en el pas 2.

L'estratègia proposada va ser estudiada amb l'exemple de la imatge de la cèl·lula HeLa obtinguda amb microscòpia FT-IR amb radiació de Sincrotró, de la qual ja s'han mostrat els resultats de resolució amb el mètode MCR-ALS. Seguint el procediment descrit anteriorment, primer es van determinar el nombre d'imatges de baixa resolució espacial (LR) de mida de píxel ($3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$) necessari per a l'obtenció d'una imatge d'alta resolució espacial (HR) de dimensió 90×42 píxels ($L_1 \times L_2$) amb una mida de píxel de $0,6 \times 0,6 \mu\text{m}^2$. En aquestes condicions es va definir un nombre de 36 imatges de baixa resolució atès que el criteri imposat per a l'algoritme de superresolució (vegeu apartat 4.6) estableix que $L_1 L_2 \leq N M_1 M_2$, on L_1 i L_2 són el nombre de píxels de la imatge d'alta resolució espacial que es vol obtenir, M_1 i M_2 són el nombre de píxels de les imatges de baixa resolució espacial i N és el nombre d'imatges de baixa resolució necessàries per a la millora de la resolució espacial de la imatge. Si $N=36$, $L_1=90$ i $L_2=42$, una possibilitat va ser que M_1 fos igual a 7 i M_2 igual a 15. Així doncs, es van enregistrar un nombre total de 36 imatges de baixa resolució de 15×7 píxels amb una mida de píxel de ($3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$) on el desplaçament entre cadascuna d'elles va ser de $0,6 \mu\text{m}$ en la direcció x i/o y . La figura 5.2.1.2.2.1 mostra gràficament el desplaçament present entre cadascuna de les imatges en les dues direccions de la superfície de la mostra.

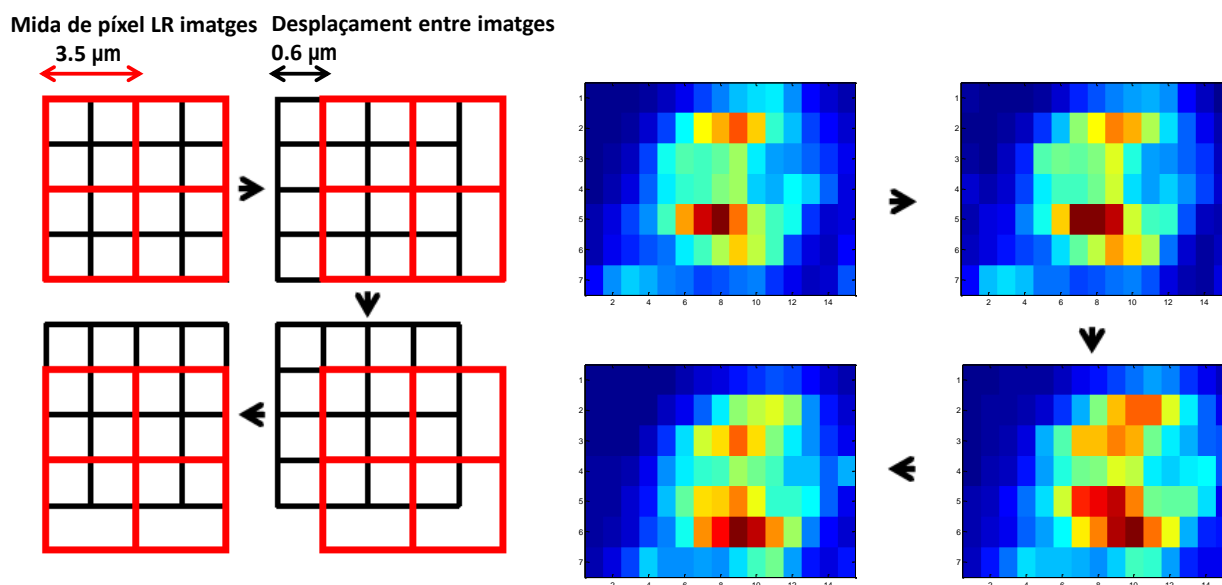


Figura 5.2.1.2.2.1 A l'esquerra, esquema del disseny d'adquisició de les imatges de baixa resolució d'una única cèl·lula HeLa. Mida de píxel de les imatges de baixa resolució (LR) $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$ i mida de desplaçament entre imatges $0,6 \mu\text{m}$. A la dreta, els mapes d'intensitat global de quatre de les imatges de baixa resolució espacial (LR) desplaçades en ambdues direccions espacials x i y.

Un cop dissenyat el pla d'adquisició d'imatges es combinen l'anàlisi de resolució conjunta d'imatges MCR-ALS i l'algoritme de superresolució per a l'obtenció d'una imatge de major qualitat (vegeu figura 5.2.1.2.2.2).

Primer es duu a terme l'anàlisi conjunta mitjançant MCR-ALS de les 36 imatges de baixa resolució. Tal com s'ha exposat en l'apartat 5.2.1.1, es van obtenir els 36 mapes de distribució espacial i els espectres purs (vegeu figura 5.2.1.1.1b) per a cadascuna de les tres contribucions cel·lulars (nucli, membrana i citoplasma).

Els mapes de distribució resolts de les 36 imatges de baixa resolució són emprats com a informació de partida per a l'adaptació de l'algoritme de postprocessat de superresolució (vegeu figura 5.2.1.2.2.2). L'ús dels mapes de distribució redueix dràsticament el temps de càlcul respecte a l'ús de cada canal espectral de les imatges i proporciona millors resultats, ja que els mapes de distribució contenen informació específica i individual de cadascun dels constituents de la imatge (en aquest cas informació sobre les diferents contribucions de la cèl·lula HeLa) sense la

Aquesta nova manera de superar els límits instrumentals de resolució espacial va ser validada per comparació dels resultats obtinguts amb els procedents de l'anàlisi individual d'una imatge d'elevada resolució espacial enregistrada amb el mateix sistema d'adquisició sobre la mateixa mostra, tal i com s'ha esmentat en la secció 5.2.1.1. La imatge d'elevada resolució presenta una mida de píxel de $0,8 \times 0,8 \mu\text{m}^2$ i els resultats obtinguts de la seva anàlisi mitjançant MCR-ALS es van considerar com a informació de referència. En la figura 5.2.1.2.2.3 es mostren els mapes de distribució de la imatge d'elevada resolució espacial i els mapes superresolts provinents de la estratègia anteriorment presentada. Es pot observar que els mapes superresolts presenten una definició espacial igual o millor que els mapes obtinguts a partir de la imatge experimental d'alta resolució de referència. Per tant, es confirma la viabilitat de l'estratègia proposada com a manera d'augmentar la resolució espacial d'una imatge. Un cop més, els mapes de distribució resolts per MCR-ALS demostren el seu potencial per ser emprats com a informació de partida en el postprocessat de la imatge.

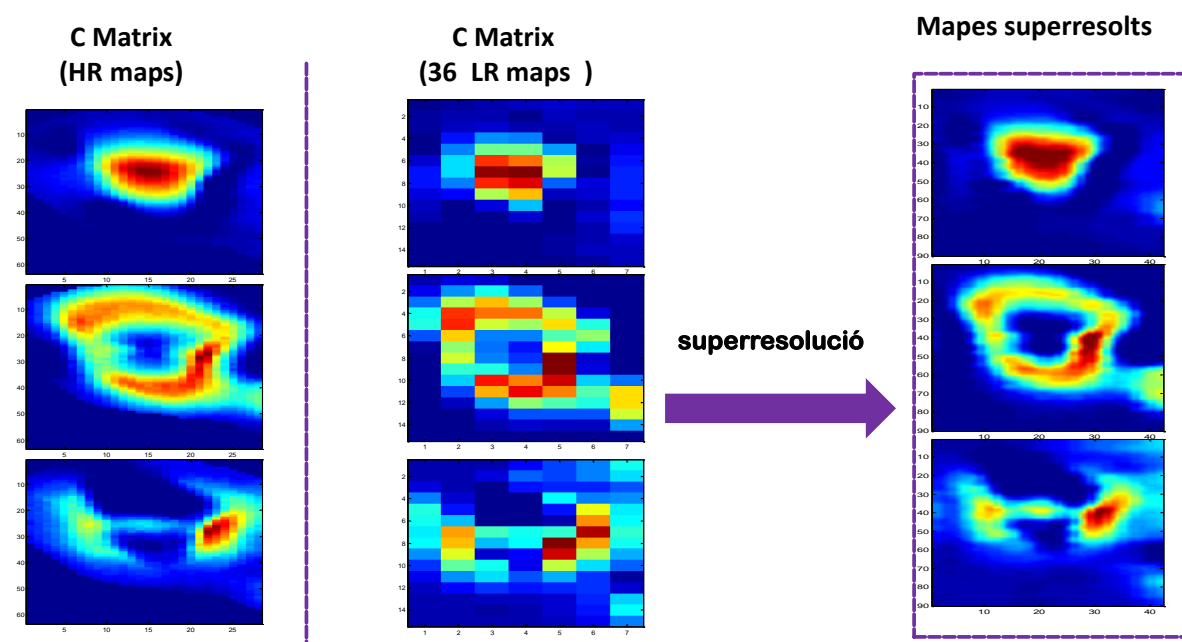


Figura 5.2.1.2.2.3 A l'esquerra es troben representats els mapes de distribució resolts corresponents a la imatge d'alta resolució espacial (imatge de referència). A la dreta es troba representat l'obtenció dels mapes superresolts mitjançant l'ús dels mapes resolts d'un conjunt d'imatges de baixa resolució espacial.

Per a finalitzar aquesta secció, es mostra un nou protocol metodològic, que inclou les etapes de preprocessat, resolució i post-processat associades a l'anàlisi conjunta d'imatges hiperespectrals obtingudes amb la mateixa tècnica.

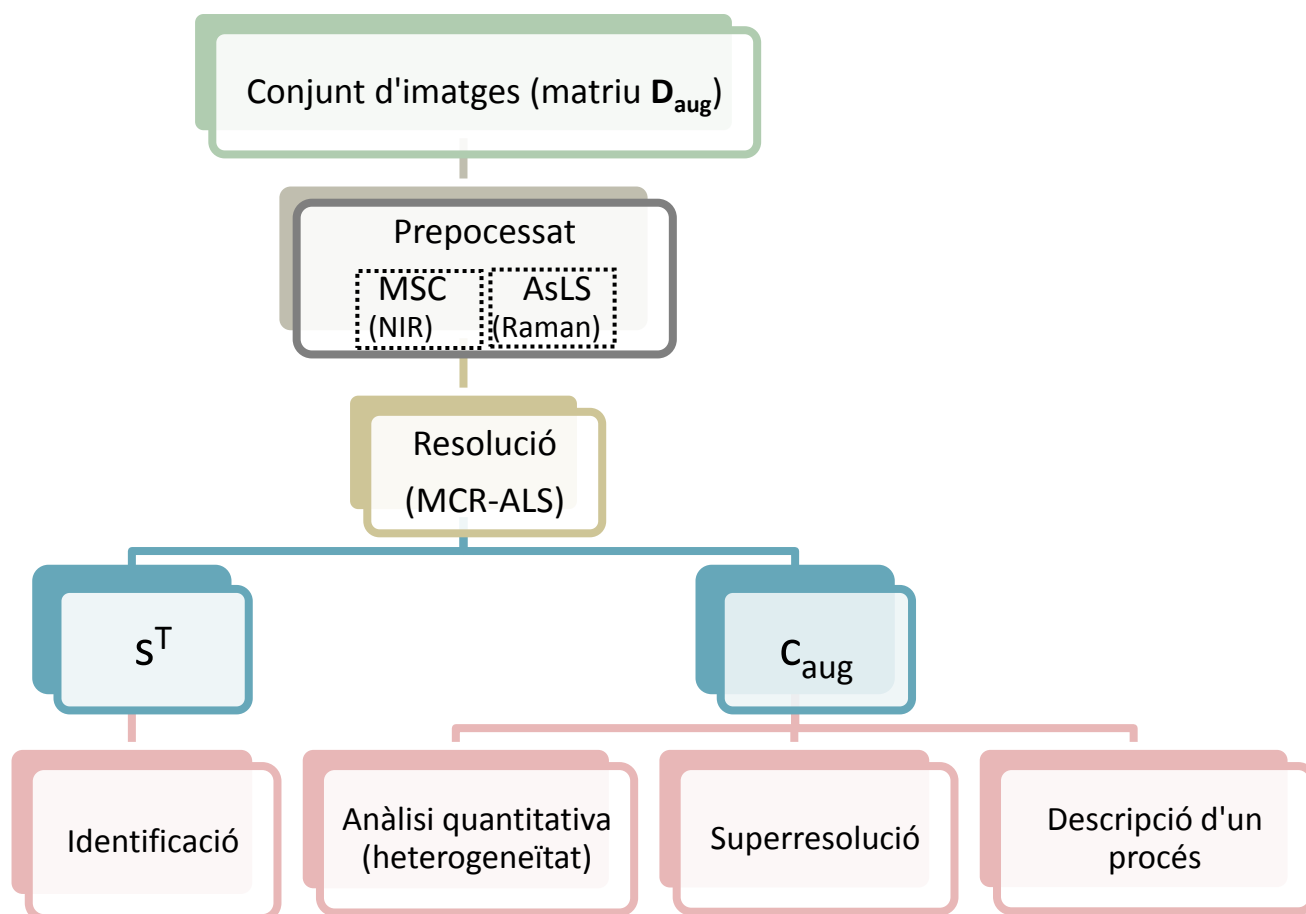


Figura 5.2.1.2.2.4 Protocol metodològic per a l'anàlisi multiconjunt d'imatges Raman i IR.

Com es pot observar, els resultats propis de l'anàlisi MCR-ALS proporcionen informació molt útil sobre els constituents de les mostres. A més, els mapes de distribució són una excel·lent informació de partida per a altres tasques, com l'anàlisi quantitativa i estudis d'heterogeneïtat, l'augment de resolució espacial de les imatges adquirides instrumentalment i la descripció de l'evolució d'un procés a través de l'estudi de les imatges adquirides durant el seu decurs.

5.2.2 Bibliografia

- (1) Tauler, R. (2001) Calculation of maximum and minimum band boundaries of feasible solutions for species profiles obtained by multivariate curve resolution. *J. Chemom.* 15, 627–646.
- (2) Grzesiak, A. L., Lang, M., Kim, K., and Matzger, A. J. (2003) Comparison of the Four Anhydrous Polymorphs of Carbamazepine and the Crystal Structure of Form I. *J. Pharm. Sci.* 92, 2260–2271.
- (3) Dugué, J., Céolin, R., Rouland, J. C., and Lepage, F. (1991) Polymorphism of carbamazepine: solid-state studies on carbamazepine dihydrate. *Pharm. Acta Helv.* 66, 307–10.
- (4) Krahn, F. U., and Mielck, J. B. (1987) Relations between several polymorphic forms and the dihydrate of carbamazepine. *Pharm. Acta Helv.* 62, 247–54.
- (5) Jaumot, J., and Tauler, R. (2010) MCR-BANDS: A user friendly MATLAB program for the evaluation of rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 103, 96–107.
- (6) Amigo, J. M. (2010) Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 93–109.
- (7) Reich, G. (2005) Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1109–43.
- (8) Burger, J., and Geladi, P. (2006) Hyperspectral NIR imaging for calibration and prediction: a comparison between image and spectrometer data for studying organic and biological samples. *Analyst* 131, 1152–1160.
- (9) Burger, J., and Geladi, P. (2007) Spectral pre-treatments of hyperspectral near infrared images: analysis of diffuse reflectance scattering. *J. Near Infrared Spectrosc.* 15, 29–38.
- (10) Juan, A. de, Maeder, M., Hancewicz, T., Duponchel, L., and Tauler, R. (2009) Chemometric tools for image analysis' in Infrared and Raman spectroscopy, in *Infrared and Raman Spectroscopy Imaging* (Reiner Salzer, and H. W. S., Ed.), pp 65–109. Wiley-VCH.
- (11) Juan, A. de, Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M., and Maeder, M. (2004) Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 23, 70–79.
- (12) Gallagher, N. B., Shaver, J. M., Martin, E. B., Morris, J., Wise, B. M., and Windig, W. (2004) Curve resolution for multivariate images with applications to TOF-SIMS and Raman. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73, 105–117.
- (13) C. Cairós, J. (2009) Espectroscopia de imagen en el infrarrojo próximo. Caracterización instrumental y aplicación al análisis de productos sólidos. Universitat Autònoma de Barcelona.
- (14) Gendrin, C., Roggo, Y., and Collet, C. (2008) Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 533–53.

- (15) Gy, P. M. (1992) Sampling of Heterogeneous and Dynamic Material Systems: Theories of Heterogeneity, Sampling and Homogenizing. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- (16) Dubois, J., Wolff, J., Warrack, J. K., Schoppelrei, J., and Lewis, E. N. (2007) NIR Chemical Imaging for Counterfeit Pharmaceutical Products Analysis Counterfeit pharmaceutical products are a real threat to the health of patients, and to the health of patients. *Spectroscopy* 22, 41–50.
- (17) Farsiu, S., Robinson, M. D., Elad, M., and Milanfar, P. (2004) Fast and Robust Multiframe Super Resolution. *IEEE Trans. Image Process.* 13, 1327–1344.
- (18) Ng, M. K., and Bose, N. K. (2003) Mathematical analysis of super-resolution methodology. *IEEE Signal Process. Mag.* 20, 62–74.
- (19) Duponchel, L., Milanfar, P., Ruckebusch, C., and Huvenne, J.-P. (2008) Super-resolution and Raman chemical imaging: from multiple low resolution images to a high resolution image. *Anal. Chim. Acta* 607, 168–75.
- (20) Elad, M., and Feuer, A. (1997) Restoration of a single superresolution image from several blurred, noisy, and undersampled measured images. *IEEE Trans. Image Process.* 6, 1646–58.

5.3. DISSENY D'UN PROTOCOL METODOLÒGIC PER A LA IDENTIFICACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE TEIXITS BIOLÒGICS MITJANÇANT IMATGES HIPERESPECTRALS

En aquest apartat es mostra l'article que fa referència a l'estudi d'identificació i diferenciació de teixits biològics mitjançant la combinació de l'anàlisi de resolució i segmentació d'estructures multiconjunt. Aquest treball se centra en la combinació dels mètodes de resolució i segmentació en mode d'anàlisi multiconjunt per a l'anàlisi de dues poblacions d'imatges de mostres biològiques, representatives d'estats patològics diferents. La finalitat de l'estudi és el desenvolupament d'una estratègia general que permeti diferenciar els diferents tipus de teixits biològics i identificar les petites diferències entre les diferents poblacions de mostres biològiques per a un correcte diagnòstic clínic. Com aportació metodològica general, és important fer notar que el concepte d'anàlisi multiconjunt s'incorpora per primer cop als mètodes de segmentació. Com a aportació específica per a l'estudi de mostres biològiques, la seqüència resolució multiconjunt d'imatges → segmentació multiconjunt sobre mapes de distribució → resolució multiconjunt local sobre píxels de les classes segmentades ajuda extraordinàriament a modelar les petites diferències entre subregions de teixits biològics.

5.3-I Sara Piqueras, Christoph Krafft, Claudia Beleites, Kokila Egodage, Fredinan von Eggelling, Orlando Guntinas-Lichius, Jürgen Popp, Romà Tauler i Anna de Juan. ***Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues***. *Analytica Chimica Acta* 881 (2015) 24-36.

La variació espectral entre diferents tipus de teixits biològics i diferents estats patològics és sovint molt petita. Per això, el desenvolupament o adaptació d'eines d'anàlisi per a l'exploració de les dades i la detecció i interpretació d'aquestes diferències resulta clau. L'objectiu principal d'aquest article és plantejar una estratègia capaç d'identificar aquestes petites diferències mitjançant l'ús d'eines quimiomètriques que permetin una interpretació correcta de les imatges per a un diagnòstic clínic precís. L'estratègia combina mètodes de resolució mitjançant MCR-ALS i mètodes de segmentació per a identificar i caracteritzar diferències morfològiques i de

composició entre dues poblacions de mostres. La idea de l'anàlisi multiconjunt en totes les etapes de l'estratègia és fonamental per a la identificació dels diferents tipus de teixits biològics i per a la selecció de teixits anàlegs en les dues poblacions que, per comparació, permetin descobrir petites diferències espectrals associades als estats patològics que representen. Concretament, aquest treball mostra el potencial de l'estratègia proposada mitjançant l'estudi d'un conjunt d'imatges d'amígdals inflamades i no inflamades adquirides mitjançant un sistema FT-IR durant una estada a l'Institut Tecnològic de Jena (Alemanya).



Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues



S. Piqueras^{a,b,*}, C. Krafft^c, C. Beleites^c, K. Egodage^c, F. von Eggeling^{c,d,e},
O. Guntinas-Lichius^e, J. Popp^{c,d}, R. Tauler^b, A. de Juan^a

^a Chemometrics group, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Environmental Chemometrics Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Diagnostic (IDAEA-CSIC), Barcelona, Spain

^c Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena, Germany

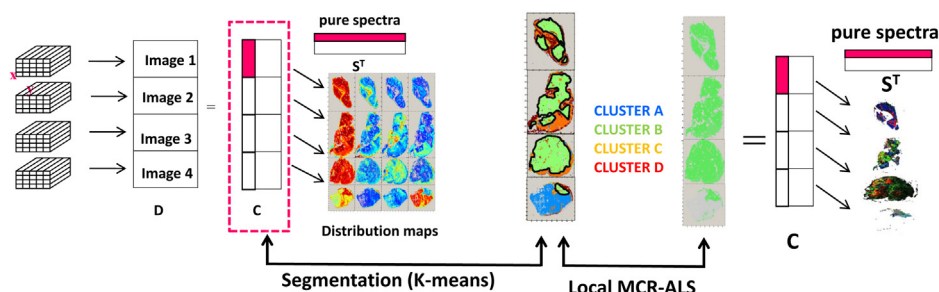
^d Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, University Jena, Germany

^e Department of Otorhinolaryngology, Jena University Hospital, Germany

HIGHLIGHTS

- Image resolution combined with segmentation characterizes biological samples.
- Multiset analysis mode in the full data analysis workflow ensures consistent results.
- Global resolution/segmentation/local resolution is the sequence proposed.
- Subtle spectral changes defining tissue subregions and health conditions are modeled.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2014

Received in revised form 24 April 2015

Accepted 28 April 2015

Available online 2 May 2015

Keywords:

FTIR macroscopic imaging

Multiset analysis

Image resolution

Unmixing

Local MCR-ALS

Image multiset segmentation

Tonsil inflammation disease

ABSTRACT

Hyperspectral images can provide useful biochemical information about tissue samples. Often, Fourier transform infrared (FTIR) images have been used to distinguish different tissue elements and changes caused by pathological causes. The spectral variation between tissue types and pathological states is very small and multivariate analysis methods are required to describe adequately these subtle changes.

In this work, a strategy combining multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS), a resolution (unmixing) method, which recovers distribution maps and pure spectra of image constituents, and K-means clustering, a segmentation method, which identifies groups of similar pixels in an image, is used to provide efficient information on tissue samples. First, multiset MCR-ALS analysis is performed on the set of images related to a particular pathology status to provide basic spectral signatures and distribution maps of the biological contributions needed to describe the tissues. Later on, multiset segmentation analysis is applied to the obtained MCR scores (concentration profiles), used as compressed initial information for segmentation purposes. The multiset idea is transferred to perform image segmentation of different tissue samples. Doing so, a difference can be made between clusters associated with relevant biological parts common to all images, linked to general trends of the type of samples analyzed, and sample-specific clusters, that reflect the natural biological sample-to-sample variability. The last step consists of performing separate multiset MCR-ALS analyses on the pixels of each of the relevant segmentation clusters for the pathology studied to obtain a finer description of the related tissue

* Corresponding author at: Chemometrics group, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 676634744.
E-mail address: piqueras.sara@gmail.com (S. Piqueras).

parts. The potential of the strategy combining multiset resolution on complete images, multiset segmentation and multiset local resolution analysis will be shown on a study focused on FTIR images of tissue sections recorded on inflamed and non-inflamed palatine tonsils.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Tonsillitis is the inflammation of tonsils and is especially common in children. Inflammation of the palatine tonsils is usually treated medically, although in patients with symptomatic recurrent tonsillitis, surgical intervention may be indicated. So far, decision making for such an intervention is exclusively based on patient's history and complaints. The epithelium of the human palatine tonsil is a region of interest because it contains a mass of lymphoid tissue that forms a first line of defense in protecting the oropharyngeal isthmus and, as such, is constantly exposed both to airborne and alimentary antigens [1]. Their anatomic location and their inherent function as organ of immunity, processing infectious material, make the epithelium a tissue region to diagnose the tonsil inflammation condition [2,3]. Such a tissue-based approach would help to improve decision making for or against surgery in case of recurrent tonsillitis.

Fourier transform infrared (FTIR) imaging is a vibrational spectroscopic technique that is increasingly applied in biomedical spectroscopy [4–8]. It contains spatial and spectral information and provides details of the chemical composition and molecular structures in cells and tissues. This method represents an improvement on histopathology assessment, since it is a non-destructive technique that does not require extrinsic contrast-enhancing agents to identify variations that occur between healthy and diseased tissues and provides much richer chemical information about the samples analyzed. This technology can potentially help in the pathological assessments, reducing the subjective inter- and intra-observer influence in the diagnosis method [9–14]. However, FTIR imaging collects a large number of spectra from large sample areas, generating huge data sets which contain mixed information of different tissue types. In this case, chemometric tools are crucial to handle the derived data [15,16].

Multivariate image resolution and segmentation analysis are common approaches used to characterize different biological components of tissues and to distinguish the small spectral variations between healthy and diseased tissue [17–19]. Multivariate resolution image analysis focuses on recovering concentration profiles (folded back into distribution maps) and pure spectra of image constituents under the assumption of a spectroscopic bilinear model. Image segmentation is oriented to identify groups of similar pixels (clusters) in an image; that is, pixels with similar spectra and, therefore, similar composition and chemical or biological properties [20]. Many tools are available for image segmentation. Unsupervised algorithms are commonly applied when insufficient or no prior knowledge is available, such as often occurs in the search of new biological prognostic factors [14,13,21]. Segmentation analysis is a common tool used for differentiation of tissue regions. Segmentation clusters, often represented in a false color map, may be potentially useful to compare with conventionally stained sections to assist identifying both anatomical and histopathological features.

The goal of this work is proposing a general data analysis protocol for the characterization of biological tissue types and for a better differentiation among tissue subregions or tissue parts in different health conditions. To achieve the purpose, we have tested a combination of image resolution (unmixing) and segmentation methods in FTIR images of inflamed and non-inflamed tonsil tissues. Multivariate curve resolution-alternating least squares

(MCR-ALS) was selected as a resolution algorithm because it has been proven to adapt particularly well to hyperspectral image analysis due to the ease of the introduction of external spectral and spatial information about the image and the ability to work with single and multiset image arrangements [22–24]. K-means clustering was chosen as unsupervised segmentation algorithm since it is a computationally-efficient 'hard' clustering method for large image data sets, such as those coming from hyperspectral images, consisting of thousands of pixel spectra [23,25,26].

The data analysis workflow proposed is applied separately to the two sample populations of interest (inflamed and non-inflamed tonsils, in this case). All the samples showing the same health condition (same population) are treated together in a multiset structure following the three steps below:

- a) Multiset MCR-ALS resolution on full images. Basic spectral signatures and distribution map of the biological contributions to describe the different tissue types are recovered.
- b) Multiset K-means image segmentation analysis on the MCR scores (concentration profiles), used as compressed initial pixel information. Segmentation maps are obtained using the information of all images simultaneously. Some relevant clusters, common to all images and used for general diagnostic studies, and few sample-specific clusters, which reflect the natural sample-to-sample variability, are obtained.
- c) Multiset local MCR-ALS analyses on pixel spectra from each relevant cluster for diagnostic (one multiset analysis per cluster). Finer spectral and spatial details that can distinguish better among tissue subregions are obtained.

A relevant novelty of this strategy is the use of the concept of multiset analysis, i.e., the analysis of several images coming from different samples simultaneously in a single data set structure (multiset), in the full data analysis workflow. The general value of multiset analysis has been proven since long in MCR works, where it helps to provide more robust resolved contributions, less affected by noise and ambiguity phenomena [27–30]. In a biological context, this means that resolved spectral signatures will define much better general trends of the population of samples analyzed together than if images were analyzed one-by-one. A similar benefit applies to multiset segmentation analysis, where segmentation classes associated with all samples of the same population will be more easily identified and better characterized than if each image was segmented separately and results were compared afterwards.

Within the multiset analysis framework, we have opted in this work for analyzing the two populations of samples (FTIR images of four of inflamed and four non-inflamed tonsil samples) in two separate multisets instead of building a single multiset with all samples together. The reason to support this decision is that the main goal is a good characterization of the two populations of samples through clear basic spectral signatures that could be compared afterwards. Since raw IR spectra of biological constituents are very similar among them and so is the nature of the two populations of samples compared, a single multiset with all samples would have the risk to confound the spectroscopic variability of the different health status with the spectroscopic biological variability among samples. Therefore, finding the subtle spectroscopic differences among the two populations of samples

for a structural interpretation can be done much more easily using the resolved spectral signatures coming from the two separate multisets (cleaner and general for all samples of the same population) rather than working with a multiset of the raw spectra of images from all samples together.

2. Experimental (sample preparation and image acquisition)

2.1. Tissue preparation

Eight palatine tonsil samples (four tonsils of patients with chronic recurrent tonsillitis and four non-inflamed tonsils) from different human patients were provided by the Department of Otorhinolaryngology, Jena University Hospital.

The unfixed tissue was snap frozen and embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Netherlands) freezing medium to prevent freezing artifacts and stored at -80°C until further use. Cryosections of 10 mm thickness were prepared on CaF_2 slides and dried in ambient air. The dried cryosections were used without further treatment.

2.2. FTIR image acquisition

FTIR images were recorded in transmission mode using an Agilent 670-FTIR spectrometer and Agilent 620 FTIR microscope with 64×64 focal plane array detector. A $15\times$ Cassegrain objective together with twofold beam expansion yielded a total magnification of $7.5\times$ and a field of view of $725 \times 705 \mu\text{m}$ per image. The pixel size is $11 \times 11 \mu\text{m}^2$. The sections were measured in mosaic data acquisition mode, which acquires a series of FTIR images covering the whole sample area and composes them into one large image. Binning was done on each small image, averaging 2×2 or 4×4 adjacent pixels depending of the physical size of the tissue section. Binned small images were composed to provide the final full image analyzed. For the present study, binned images between 144×96 pixels (smallest image) and 224×192 pixels (largest image) per sample were used. Spectra were acquired in the spectral range of $900\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ at a spectral resolution of 4 cm^{-1} with 32 accumulated scans.

3. Data analysis

3.1. Data preprocessing

The spectra from FTIR images can be distorted by many reasons, such as changes in sample thickness, scattering and instrumental factors. For this reason, data preprocessing is required to extract the biological information and to remove undesirable signal contributions [31]. The data pretreatment performed includes

detection of anomalous pixels, baseline correction and smoothing. All FTIR images were imported into MATLAB[®] and analyzed with in-house written routines.

The detection of anomalous pixels consisted of removing pixel spectra with extremely low or high global intensities, due to holes or too thick areas (folding) in tissue sections, saturation effects due to nonlinear detector response, non-tissue impurities or dead pixels of the FPA detector [32]. To correct for that, the distorted pixel spectrum was replaced by the average spectrum from the area of 9×9 neighboring pixels. Spikes due to saturation effects were also detected and the anomalous readings replaced by those obtained using cubic spline interpolation taking five spectral readings of normal neighboring channels on each side of the anomalous reading. Pixels including only the sample support (CaF_2 slides) were not included in the analysis [23].

Baseline correction was performed by asymmetric least squares (AsLS) [33]. AsLS is a sophisticated method capable of handling irregularly shaped baselines changing from pixel to pixel, such as those coming from fluorescence contributions in Raman images [23] or from Mie scattering in FTIR images from biological samples [22]. The AsLS method is based on a recursive fitting of the whole spectrum with a baseline. The fitting depends on two parameters: one linked to the smoothness of the fit (λ) and one to the penalty imposed on the channels above the fitted baseline (p), which vary depending on the baseline contribution [15]. In this case, the image data presented two differentiated spectral zones ($950\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$, $2800\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$) where the baseline contribution was irregular. AsLS was applied separately in these two spectral ranges, setting suitable p and λ parameters.

Finally, spectra were smoothed by the Savitzky–Golay method using 7 point window width and second order polynomial degree. The wavenumber range below 950 cm^{-1} was not used because of the cutoff of the CaF_2 substrate. The wavenumber ranges between $1800\text{--}2750 \text{ cm}^{-1}$ and above 3500 cm^{-1} present a flat null signal and were not used for the biological samples studied (Fig. 1).

3.2. Hyperspectral image resolution

The goal of hyperspectral image resolution and, consequently, of the multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) algorithm, is the decomposition of the original raw image data into the distribution maps and pure spectra of the constituents present in the imaged sample [34,27,28,35,30]. Typically, resolution methods are based on the recovery of the bilinear model of Eq. (1), where **D** is the original raw spectra matrix, **C** contains the concentration profiles of the pure components and **S^T** the related pure spectra. **E** accounts for the experimental error contained in the raw measurement.

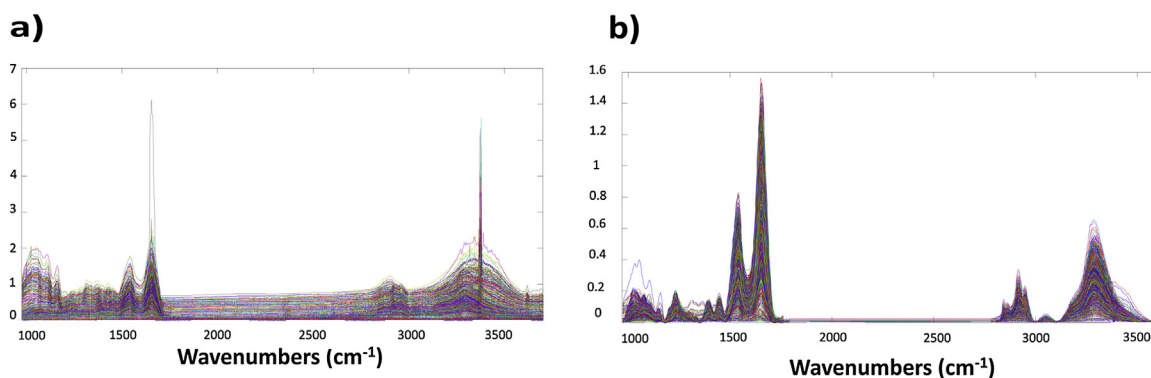


Fig. 1. (a) Raw spectra of a tonsil image, (b) corrected spectra after preprocessing (see text for details).

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

In the case of hyperspectral images, the measurement obtained can be well described by a bilinear model based on the Beer–Lambert law (Eq. (1)). Even though hyperspectral image information is structured as a data cube (3D), where x and y are the spatial pixel coordinates and λ is the third spectral dimension, the data cube is unfolded into a data matrix, where the rows are all the pixel spectra put one below the other and the columns are the wavelengths or spectral channels. The \mathbf{D} matrix contains the original raw pixel spectra, which are decomposed into the concentration profiles (\mathbf{C} matrix) and pure spectra (\mathbf{S}^T matrix) of the constituents present in the image. Every row of the \mathbf{S}^T matrix correspond to the pure spectra of an image constituent, while every column of the concentration profiles to the related pixel-to-pixel variation of its chemical concentration. It should be pointed out that each column of the \mathbf{C} matrix can be refolded appropriately in order to recover the original two-dimensional spatial image structure (pure distribution maps).

MCR-ALS is an iterative resolution algorithm suitable to work with many different kinds of data sets. The general steps of the MCR-ALS algorithm have been adapted as follows to analyze the hyperspectral images in this study.

- (1) Determination of the number of constituents in the raw image (\mathbf{D}).
- (2) Generation of initial estimates of the \mathbf{S}^T matrix based on a method to select the purest pixel spectra by a method based on SIMPLISMA [36].
- (3) Least-squares calculation of \mathbf{C} and \mathbf{S}^T under constraints until convergence is achieved.

The first step consists of determining the number of constituents by principal component analysis of the whole preprocessed image, \mathbf{D} matrix [34,36]. Then, the iterative optimization process starts using the original data \mathbf{D} and an initial guess, often from the \mathbf{S}^T matrix in image analysis. The \mathbf{S}^T initial estimate can be formed by pixel spectra picked up from the image according to previous knowledge (from pixels in regions of interest, ROI) or as a result of applying chemometric tools for purest pixel selection, such as SIMPLISMA [36]. Step 3 involves the operations $\mathbf{C} = \mathbf{D}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ and $\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$, respectively. When the original data is well reproduced by the bilinear model of the resolved concentration profiles and pure spectra and there is no significant variation among the iterative cycles, the convergence criterion is achieved and the iterative process ends. The parameter used to assess the quality of the model is the lack of fit percentage (Eq. (2)):

$$\text{lof}(\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (2)$$

where d_{ij} is the element of the original data matrix in row i and column j and e_{ij} is the residual obtained from the difference between the element d_{ij} of the original data and the analogous element obtained from the MCR-ALS model.

It is important to highlight that during the MCR-ALS optimization, constraints can be used to introduce information to model the retrieved profiles. The use of constraints helps to provide chemically meaningful profiles and to decrease the ambiguity in the final results obtained. Non-negativity is the most common constraint used in hyperspectral image resolution. In this study, since concentration values and spectroscopic readings of FTIR spectra should be, by nature, positive, elements in both \mathbf{C} and \mathbf{S}^T profiles are forced to obey this constraint [35,30,37]. Normalization of spectra profiles in \mathbf{S}^T is also used to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization.

Often, the simultaneous analysis of several images can be of interest. In this case, augmented data matrices (or multisets) \mathbf{D} are built that contain different submatrices \mathbf{D}_i , linked to different individual images. A multiset structure also follows the bilinear model based on Beer–Lambert law (see Eq. (1)). In this image analysis example, multiset structures are column-wise augmented matrices, formed by the spectra of several FTIR images one below the other. Thus, \mathbf{D} is formed by as many blocks (submatrices) as images analyzed together. The bilinear decomposition $\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$ provides a single matrix \mathbf{S}^T of pure spectra, identical for all the images analyzed, and a \mathbf{C} matrix formed by as many submatrices as images in the data set. Every column of each \mathbf{C} submatrix can be refolded conveniently to recover the distribution map of each constituent present in the different images of the data set (see Fig. 2).

MCR-ALS for multiset analysis presents the option to incorporate an additional constraint called correspondence among species, which allows introducing information about the presence/absence of certain constituents in the different images. This information is encoded in a binary matrix formed by as many columns as number of constituents present in the sample and by as many rows as number of images of the data set. When a certain constituent is absent in one image, the related concentration profile is null. In biological samples, this information is usually not known beforehand. Therefore, the absence/presence of constituents is identified from the results of simpler MCR-ALS analyses where only non-negativity constraints have been applied. When almost null distribution maps are obtained for some constituents in certain samples, this are considered absent in further MCR analyses. When the hypothesis is correct, no significant worsening in the model fit should happen.

3.3. Image segmentation

The main goal of image segmentation is partitioning the image data set into groups built according to their pixel similarity, that is, similar spectra, composition, chemical and/or biological properties. Segmentation methods are often applied in biomedical samples to distinguish tissue regions in different health conditions or, in general, to detect sample regions with different biological properties [20]. Segmentation algorithms can be divided into supervised and unsupervised approaches. Unsupervised methods, which can be used without any prior information are more suited in this study, since regions or tissues with distinctive information for the diagnostic task are not known beforehand. In this work, the unsupervised K-means clustering algorithm (KMC) has been chosen, since it is a partitioning method [38] much less computationally intensive than hierarchical approaches [25]. MCR scores (\mathbf{C} matrix) have been used as input pixel information

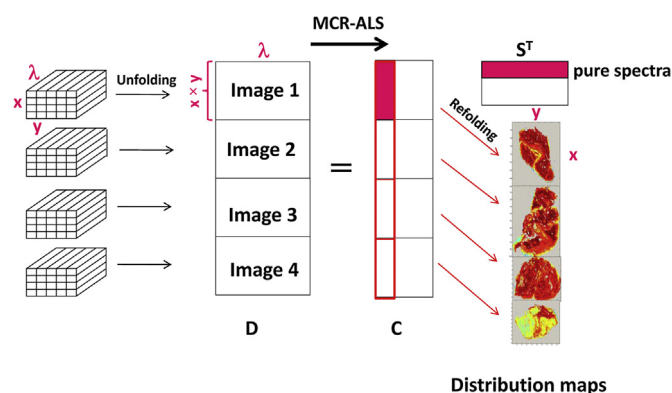


Fig. 2. MCR-ALS analysis for an image multiset structure.

for KMC analysis, since they are compressed, chemically meaningful and noise-filtered representations of the pixel composition and present more differences among them than the original pixel IR spectra [23].

The KMC algorithm works following the next steps:

1. Selection of the number of clusters, k .
2. Generation of k initial centroids.
3. Assignment of each pixel to the cluster with the closest centroid using Euclidean distance.
4. Calculation of new centroids on the basis of the groups formed.
5. Repetition of steps 3 and 4 until convergence of the cluster assignment.

When working with MCR scores as initial information in a segmentation approach, the number of clusters can be equal or slightly higher than the number of MCR contributions. Thus, a cluster can be associated with a single resolved MCR contribution or to sample regions where several resolved MCR contributions are present together in similar relative proportions in all pixels. The final number of clusters is decided finding a compromise between simplicity and interpretability of the segmentation scheme and the indications given by some auxiliary statistical indices, e.g., silhouette [23].

To avoid the problem linked to the proper initial centroid selection in the K-means algorithm, K-means has been repeated several times, each with a new set of random initial cluster centroid positions. The final K-means results are the solution with the lowest value for the sum of squares of within-cluster pixel distances to the centroids.

For an image sized $N_x \times N_y$, (here N_x and N_y denote the number of pixels in the x and y dimension, respectively), this algorithm provides a vector of dimension $N_x N_y \times 1$, where each pixel of the image is assigned to a cluster, coded with a number between 1 and k . The segmentation map can be plotted as a false color image, refolding the segmentation vector into a matrix sized $(N_x \times N_y)$ that recovers the original 2D spatial structure of the image. Segmentation maps may be potentially comparable to the outcomes of standard histopathological staining protocols, and could also be interpreted by non-spectroscopists [7].

In this work, multiset analysis has been introduced as a relevant concept to perform KMC analysis of several images simultaneously. As in the resolution case, multiset KMC analysis has been applied to several biological tissue sections of different samples in the same health conditions. The initial input information has been the MCR scores coming from the augmented C matrix, formed by as many submatrices as image data sets. As in multiset resolution analysis, the suitable segmentation maps will be obtained refolding the part of the segmentation vector that relates to each particular image.

The simultaneous segmentation analysis of several samples is of great interest, since it allows finding clusters consistently present in all samples and, thus, related to general patterns linked to a particular health condition, and sample-specific clusters, linked to the natural variability in biological samples. Differentiating these two kinds of clusters is essential, since it has to be known which variation has to be considered and which variation has to be disregarded to perform a proper diagnostic task.

3.4. General methodology to process biological tissues with different healthy conditions

Once described the resolution and segmentation algorithms used, the general strategy combining multiset MCR-ALS resolution and multiset KMC analysis to process biological images tissues is presented. The strategy is performed separately in non-inflamed and inflamed multisets and is structured in three steps.

First, multiset MCR-ALS is applied on complete images of biological tissues coming from samples in the same health condition in order to provide basic spectral signatures and distribution maps of the biological contributions needed to describe the two tissue sample populations independently.

Second, multiset KMC analysis is applied to obtain consistent tissue clusters common to all samples in the same health condition. MCR scores (concentrations profiles) are used as input pixel information for segmentation analysis since they provide a compressed and complete representation of the image pixel space. Finally, local multiset MCR-ALS is carried out onto the pixels of clusters common to all samples in the same health condition of interest, i.e., clusters related to regions which play a crucial role for diagnostic. Local multiset MCR-ALS analysis allows us to see a more detailed differentiation of the different regions within the tissues and define better the finer spectral details. Results of local MCR-ALS models can distinguish between tissue subregions in the clusters selected and can help to define in more detail the differences between the common clusters (regions) of tissues samples with different health conditions. The strategy proposed is represented in Fig. 3. This strategy might be considered as a generally applicable data analysis protocol to distinguish different biological tissue types and characterize subregions and tissues with different health conditions.

4. Results and discussion

4.1. Resolution of image multiset structures. MCR-ALS on complete images

First, to clearly identify the basic biological contributions needed to describe non-inflamed and inflamed tonsils, two

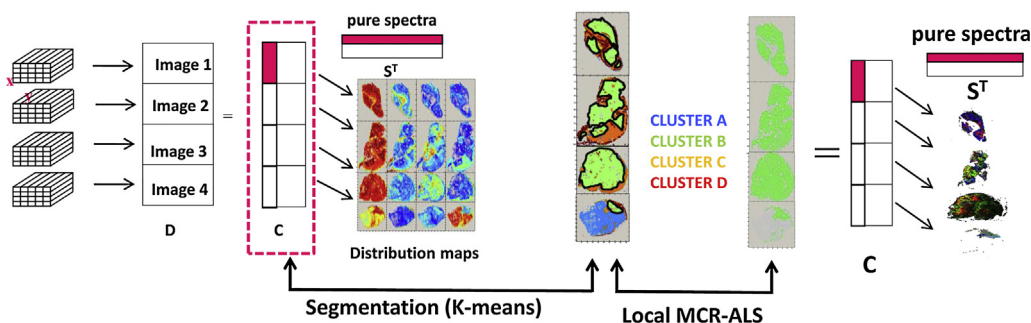


Fig. 3. Data analysis workflow to process biological tissues belonging to the same sample population. Combination of multiset MCR-ALS analysis on complete images + multiset KMC analysis + multiset local MCR-ALS analysis on spectra of clusters of interest.

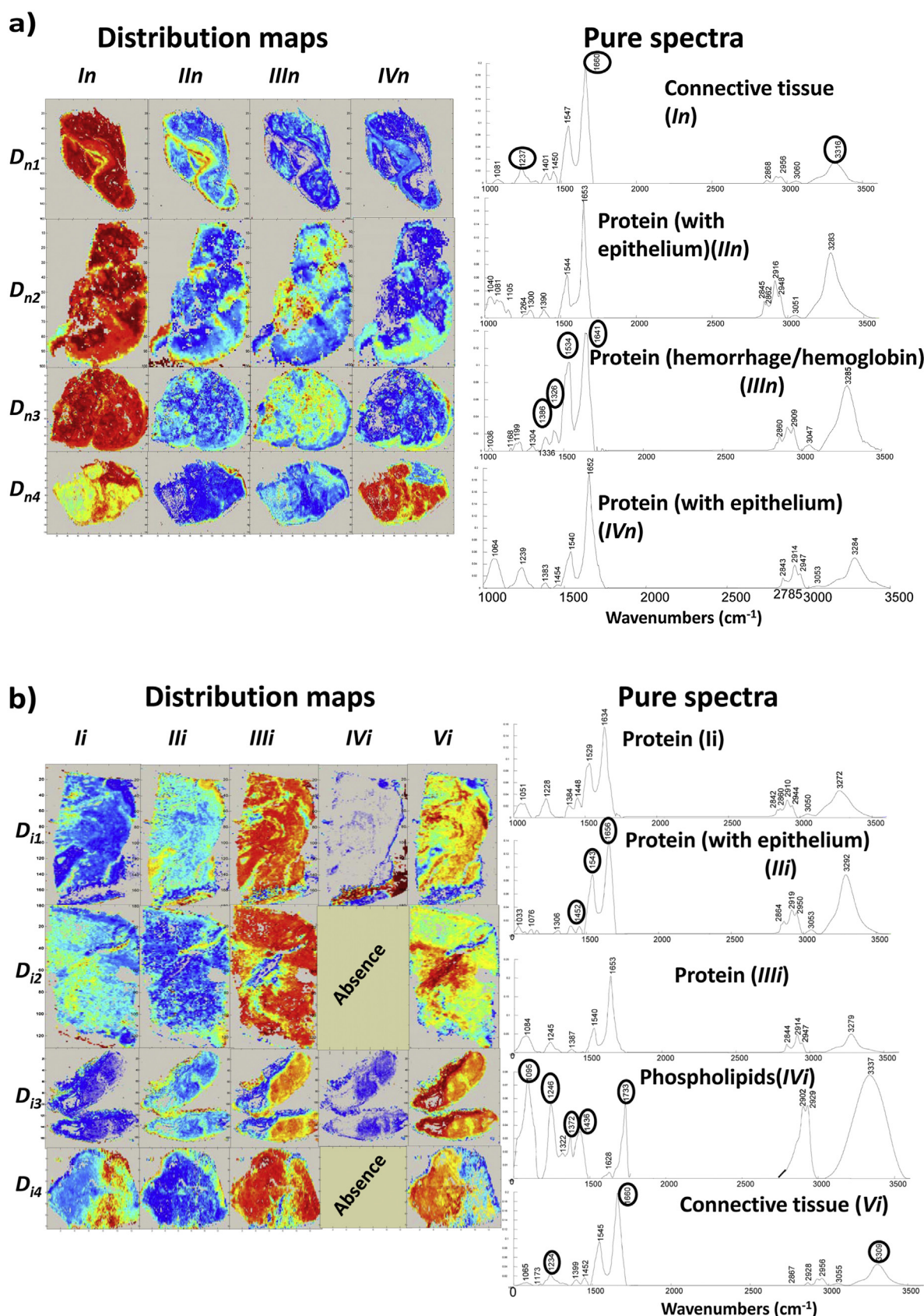


Fig. 4. (a) MCR-ALS resolution results of the multiset structure formed by complete images of non-inflamed tonsils [*D_{n1}*; *D_{n2}*; *D_{n3}*; *D_{n4}*]. Left plots: distribution maps of four pure resolved constituents (*I_n*, *II_n*, *III_n*, *IV_n*). Each line of maps represents the resolved maps of all constituents for a particular sample. Each column of maps represents the distribution map of a particular constituent in all samples analyzed. Distributions maps use a gradual color scale where the dark blue color refers to small concentration values and the red color to large values. Right plots: related pure spectra. (b) MCR-ALS resolution results of multiset structure formed by complete images of inflamed tonsils [*D_{i1}*; *D_{i2}*; *D_{i3}*; *D_{i4}*]. Left plots: distribution maps of five pure resolved constituents (*I_i*, *II_i*, *III_i*, *IV_i* and *Vi*). Right plots: related pure spectra. (For interpretation of the references to color in this figure legend as well as in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

column-wise augmented matrices were built and were analyzed separately—one formed by four non-inflamed tonsil images (\mathbf{D}_n) and one formed by four inflamed tonsil images (\mathbf{D}_i).

$$\mathbf{D}_n = [\mathbf{D}_{n1}; \mathbf{D}_{n2}; \mathbf{D}_{n3}; \mathbf{D}_{n4}]$$

$$\mathbf{D}_i = [\mathbf{D}_{i1}; \mathbf{D}_{i2}; \mathbf{D}_{i3}; \mathbf{D}_{i4}]$$

\mathbf{D}_{nj} and \mathbf{D}_{ij} stem from the j th image of non-inflamed tonsils and of inflamed tonsils, respectively. Before resolution analysis, preprocessing of the FTIR images was carried out as described in Section 3.1. Fig. 1 shows the spectra of a tonsil image before and after the preprocessing is carried out.

MCR-ALS was applied separately to each multiset structure (\mathbf{D}_n and \mathbf{D}_i) containing the corrected spectra. Singular value decomposition indicated that four and five contributions were needed to describe the variation in the multiset structures \mathbf{D}_n and \mathbf{D}_i , respectively. Initial estimates of pure spectra were obtained by SIMPLISMA. The constraints applied in the resolution analysis were non-negativity in the concentration profiles and spectra and normalization of spectra in \mathbf{S}^T matrix (using 2-norm, i.e., the Euclidean norm) in both multiset structures.

After a preliminary MCR-ALS analysis of multiset \mathbf{D}_i under non-negativity constraint we realized by inspection of distribution maps that there was one species absent in some subimages of multiset \mathbf{D}_i . Therefore, the constraint of correspondence among species was used in this multiset structure by the introduction of a small binary matrix in the resolution process called *isp*. The matrix *isp* encodes information on the presence/absence of the contributions in the different full images, assigning 0 to absent species and 1 to present species. *Is* has as many rows as number of images enclosed in the multiset structure (in this case, 4) and as many columns as number of resolved species (5) (see the matrix below for the inflamed tonsils example).

	I_i	II_i	III_i	IV_i	V_i
D_{i1}	1	1	1	1	1
D_{i2}	1	1	1	0	1
D_{i3}	1	1	1	1	1
D_{i4}	1	1	1	0	1

When doing resolution of images related to biological samples, it is important to note that each resolved contribution (component) should be interpreted as related to a basic spectral signature, reflecting a homogeneous mixture of diverse kinds of biomolecules (proteins, lipids, metabolites,...). Thus, although these signatures may be often attributed to a kind of tissue type, e.g., epithelial, connective, ... the full description of it may need the combination of contributions linked to several basic signatures to be defined. This means that a one-to-one correspondence among MCR contribution and tissue type is not strictly fulfilled. Below, we describe how the interpretation of the different resolved contributions must be carried out in this specific example.

Fig. 4 shows the resolution results for the multiset formed by non-inflamed tonsil images, \mathbf{D}_n , in Fig. 4a, and for the multiset formed by inflamed tonsil images, \mathbf{D}_i , in Fig. 4b. The resolved distribution maps of each image are displayed in the left plots of

Fig. 4 and the related pure spectra in the right plots. The lack of fit for \mathbf{D}_n was 5.41% and 2.84% for \mathbf{D}_i , which is satisfactory for FTIR measurements.

MCR-ALS multiset analysis on complete images provides the most salient biological spectral signatures and distribution maps needed to integrally describe the biological samples. Right plots in Fig. 4 show spectral signatures linked to different tissue types, such as connective tissue or epithelium.

Although, as was mentioned before, there is no necessarily a one-to-one correspondence between MCR contribution and tissue type, each contribution can be associated with some particular kind(s) of tissue types because of the morphology of the distribution maps and the spectroscopic features found in the resolved signatures. Below, the morphology of the tonsil tissues is described to understand better the description of the MCR contributions in this work.

The epithelium tissue is formed by layers of cells that line the outside and inside of organ surfaces. Concretely, palatine tonsils are lined by stratified squamous non keratinizing epithelium which dips into the crypts. Since the epithelium covers the surface of tonsil, it is generally exposed to the environment and, hence, it is in contact with a wide range of potentially aggressive or harmful chemical and physical conditions that may induce different diseases as chronic tonsillitis. Lymphatic nodules, many with prominent germinal centers, are usually arranged beneath the epithelium and are embedded in a mass of diffuse lymphatic tissue. Connective tissue is the generic denomination for all subtypes of tissues in the inner part of tonsils, which include lymphatic nodules and lymphatic diffuse tissue, blood, ... that differ significantly in form and function from each other, but take part in the organ structure [7].

With respect to characteristic spectroscopic features of tissue types, we can see that the most pronounced bands of the spectrum linked mainly to connective tissue (associated with signatures of contributions I_n from \mathbf{D}_n and V_i in \mathbf{D}_i) are in the region below 1800 cm^{-1} , while bands in the region between 2800 and 3100 cm^{-1} , associated with C—H stretching modes are less pronounced. The amide I band is observed at 1660 cm^{-1} and the amide II band at 1545 cm^{-1} . The major protein of connective tissue is collagen, which presents a amide III band at 1237 cm^{-1} , attributed to the triple helical arrangement [39]. The resolved IR spectra of proteins associated with the epithelium tissue (labeled II_n , IV_n in \mathbf{D}_n , and III_i in \mathbf{D}_i) present distinct bands at 1041 , 1081 , 1105 cm^{-1} assigned to C—O groups. These functional groups are consistent with polyglycosylated peptides in mucus that are typically produced by epithelial glands [21]. Bands at similar position, such as 1064 and 1383 cm^{-1} , were also identified in crypts, which are tubular glands in colorectal mucosa [9]. The amide I band of proteins related to epithelium tissues are observed at 1652 – 1656 cm^{-1} and amide II bands at 1540 – 1544 cm^{-1} . Due to the heterogeneity of the distinct types of mucus, the bands positions differ slightly in the literature. On the other hand, the CH stretching contributions between 2800 and 3100 cm^{-1} are more pronounced for the epithelium proteins. The resolved IR spectrum of protein associated with hemoglobin and hemorrhage (labeled III_n in \mathbf{D}_n) can be associated with diffuse lymphoid tissue, where nodules and blood vessels are found. The amide I band is located at 1641 cm^{-1} and the amide II band at 1544 cm^{-1} . Amide I and II bands show similar intensities between them.

Phospholipids (IV_i in \mathbf{D}_i) were found as basic spectral signature only in the inflamed tissues (multiset \mathbf{D}_i). The IR spectrum of phospholipids is characterized by the stretching vibrations of CH_2 and CH_3 groups of the fatty acids which lead to strong absorption between 2825 and 2950 cm^{-1} , the C=O stretching vibration of the ester groups observed at 1733 cm^{-1} and the symmetric and antisymmetric stretching vibrations of the phosphor dioxy groups

at 1095 and 1246 cm^{-1} . Note also the absence of amide I and amide II bands in the constituent spectra *IVi*.

Left plots in Fig. 4 show the distribution maps associated with the basic spectral signatures commented above. Gray distribution maps refer to absent contributions in images and the rest of the maps use a gradual color scale, where the blue color refers to small concentration values and the red color to large values. These distributions generally agree with the spatial regions in which the different tissues defined by the basic spectral signatures are expected. Connective tissue is located in the inner part of tonsil. Connective tissue of healthy tonsils (*In*) is more extended in the full sample, while the connective tissue in inflamed tonsils (*Vi*) shows signs of morphological damage. The proteins related to the non-inflamed epithelium (*IIIn* and *IVn*) are distributed covering the tonsils surface. It can also be seen (Fig. 4a) the squamous shape of epithelium, which immerses into the crypts. In contrast, the protein associated with the epithelium of inflamed tonsils (*IIIi*) is not distributed uniformly around the tonsils samples and this could be interpreted as a sign of inflammation. Proteins associated with hemoglobin appear in the inner part of connective tissue since blood is a specialized tissue usually considered as connective tissue.

Variations that may occur among the general morphology of distribution maps among different samples are due to two main factors: the natural individual variability and the fact that the sections are not completely analogous from sample-to-sample.

Once the MCR-ALS analysis on the full images is performed, the MCR scores (concentration values used to display the distribution maps of sample constituents) will be used for subsequent cluster analysis, which is the next step of the strategy proposed.

4.2. Multiset image segmentation. K-means cluster analysis

Multiset image segmentation analysis was the next step in the strategy proposed (see Fig. 3), mainly performed to look for clusters generally found in all inflamed (\mathbf{D}_i) or non-inflamed (\mathbf{D}_n) palatine tonsils in the different images. The fact of using a 'hard' partitioning clustering method, such as K-means, i.e., each pixel can be assigned to only one cluster, makes that clusters in the segmentation results could be often more directly attributed to a single tissue type and, hence, more easily comparable with classical stained histopathological images.

KMC analysis, as explained in Section 3.3, was carried out using the solved MCR scores of the multiset structures \mathbf{D}_n and \mathbf{D}_i presented in the previous section. Like in MCR-ALS, KMC was performed in the multiset of inflamed and non-inflamed images, separately. One of the advantages of using MCR scores for segmentation analysis is that the concentration profiles can be pretreated because they contain separate specific information associated with the different meaningful basic spectral signatures. Thus, in this work, we have row-normalized MCR scores (\mathbf{C}_n and \mathbf{C}_i) to balance the importance of all pixels present in each image of multiset (with high and low contribution abundances) in the segmentation analysis. This pretreatment has been helpful to distinguish the different tissue types, especially, the epithelium tissue, which provides important clinical information about tonsils inflammation and may have a lower signal intensity (and, therefore, lower concentration values).

Row-normalized concentration profiles \mathbf{C}_n were segmented simultaneously into four clusters, while row-normalized concentration profiles \mathbf{C}_i were segmented into five clusters. The number of clusters was always equal or higher than the number of resolved MCR contributions, keeping the lowest possible complexity in the segmentation results according to some clustering indices and to the meaningful interpretation of the results [23]. Segmentation maps obtained from autoscaled \mathbf{C}_n and \mathbf{C}_i profiles are shown in

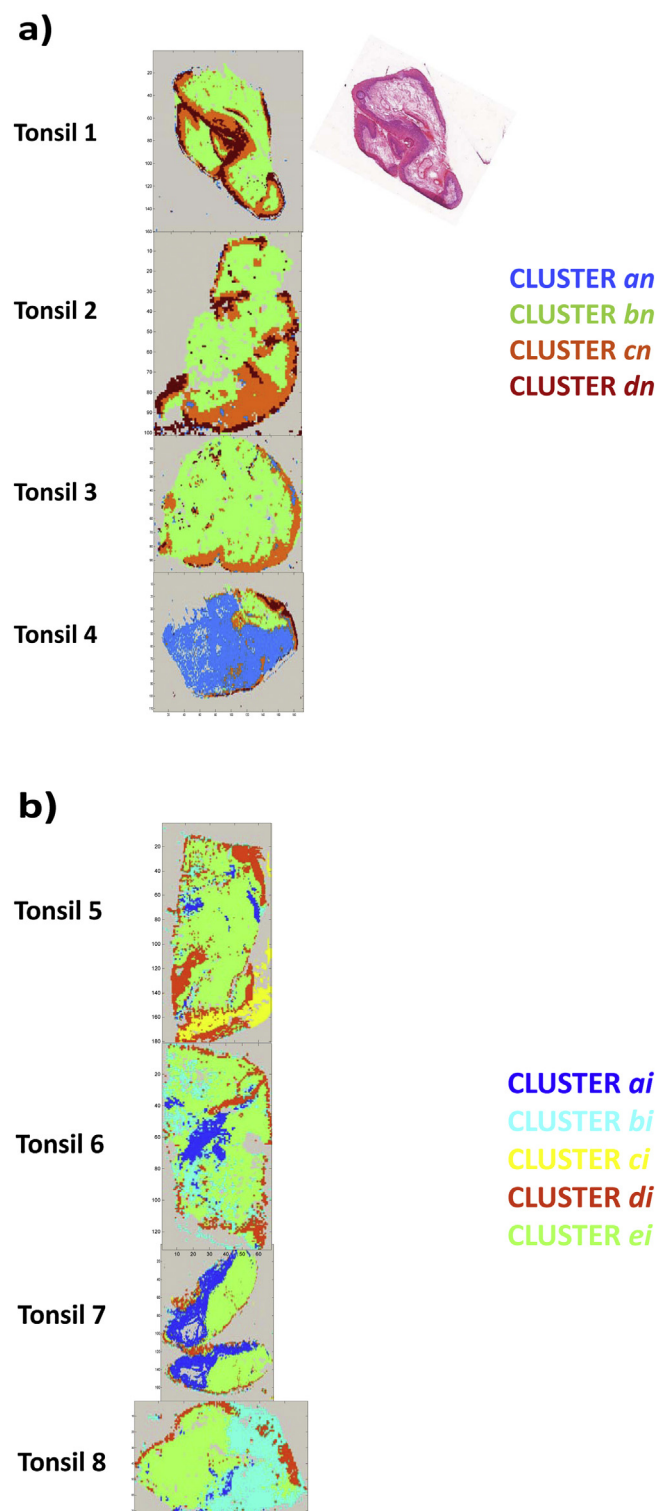


Fig. 5. Results of multiset cluster analysis of non-inflamed and inflamed human palatine tonsils (a) segmentation maps of multiset structures formed by non-inflamed tonsils. Picture on the right of tonsil 1 is the related stained histopathological image, (b) segmentation maps of multiset structures formed by inflamed tonsils.

Fig. 5. As a way of example, a classical histopathological stained image is presented in Fig. 5a for comparison with the related segmentation map. It can be observed that the stained image matches with the related segmentation map. Clusters *cn* and *dn* correspond to the epithelium tissue, they have the same spatial

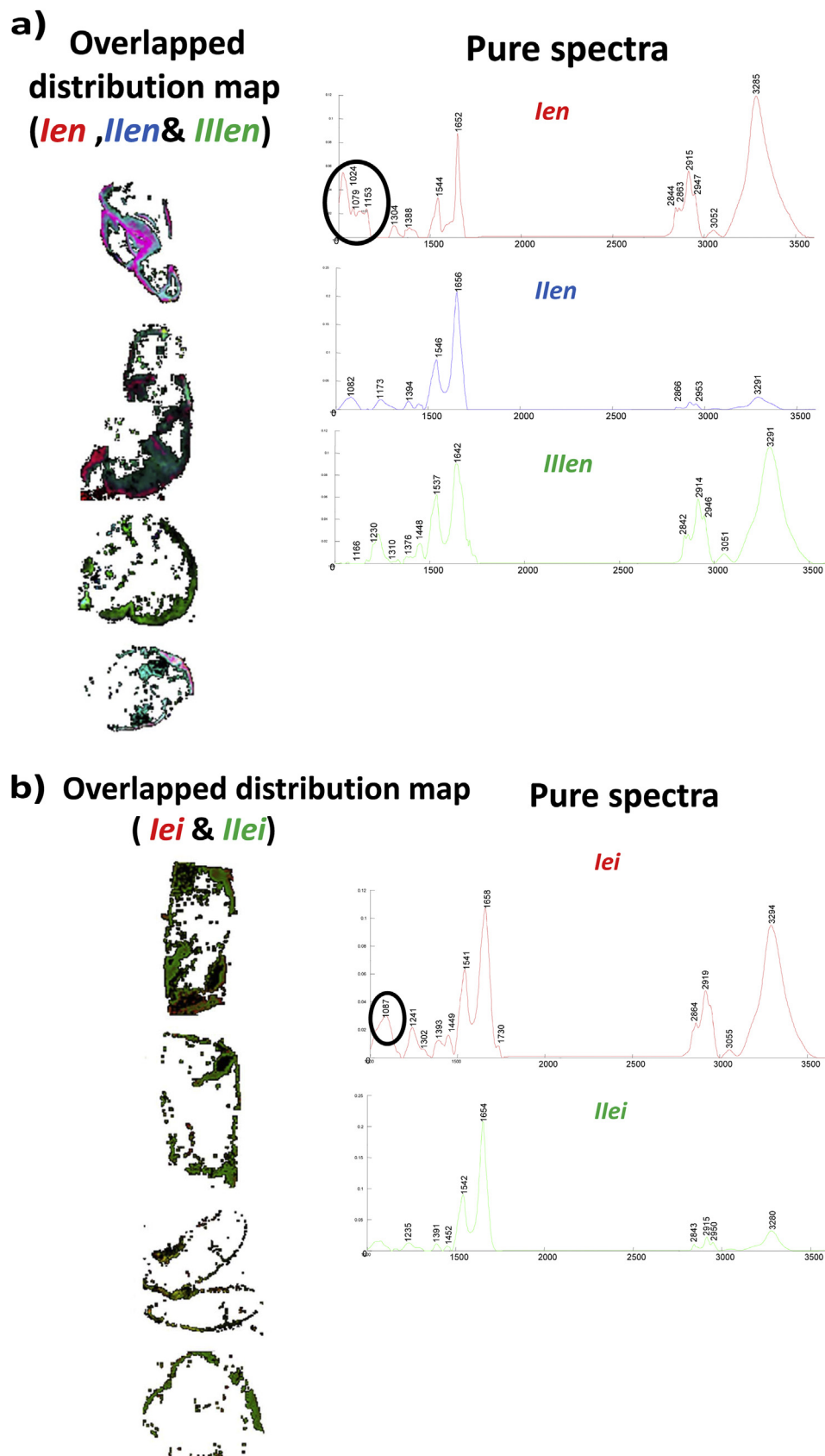


Fig. 6. (a) Local MCR-ALS resolution results of multiset structure formed by non-inflamed tonsils on epithelium tissue. Left plots: representation of distribution maps of tissue subregions overlapped into a red, green and blue (RGB) image. Right plots: related pure spectra. (b) Local MCR-ALS resolution results of multiset structure formed by inflamed tonsils on epithelium tissue. Left plots: overlapped distribution maps into a red, green and blue (RGB) image (only red and green channels are used). Right plots: related pure spectra. (For interpretation of the references to color in this figure legend as well as in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

distribution of the dark region in the stained image, while cluster *bn* is related to the connective tissue is agree with the light region of stained image.

Fig. 5a shows segmentation maps for non-inflamed palatine tonsils. Clusters *bn*, *cn* and *dn* appear in all tonsils (images), whereas cluster *an* is specific for tonsil 4. Specific clusters, i.e., *an*, appear due to the biological variability of the tissues samples and to the fact that all sections do not correspond to exactly analogous parts in the tissue in all samples. Both clusters *cn* and *dn*, defined in all samples (images), contribute to non-inflamed epithelium tissue, which covers the surface of the palatine tonsil. Below epithelium, you can see cluster *bn* in all samples, associated with connective tissue.

Fig. 5b shows segmentation maps for inflamed palatine tonsils. Clusters *ai*, *bi*, *di* and *ei* of Fig. 5b are consistent in all inflamed tonsils (images) and cluster *ci* is specific for tonsils 5 and 7, although it is difficult to see it in sample 7 because there are only a few pixels. Note that these two tonsils also appeared as needing one additional MCR resolved contribution to be described when compared with the rest of inflamed samples (see Fig. 4b). Cluster *ci* seems to be associated mainly with a specific part of tonsil 5 with a high contribution of phospholipids. According to its spatial distribution, cluster *di* relates to epithelium while cluster *ei* represents connective tissue. As mentioned before, the epithelium is a tissue region to diagnose the tonsil inflammation condition. The segmentation maps of inflamed tonsils show that the epithelium cluster penetrates into deeper tissue and is partially deteriorated, which is typical for inflammation episodes.

4.3. Resolution of image multiset structures. Local MCR-ALS

The last stage of the strategy consists of performing local MCR-ALS on the pixel spectra within the clusters of interest. Fig. 5 shows that epithelium and connective tissue are related to consistent clusters, found in all samples for both multiset structures \mathbf{D}_n and \mathbf{D}_i . Since the epithelium is the most relevant zone for tonsillitis diagnosis and immune cells responsible for the inactivation and destruction of germs live in the diffuse lymphoid tissue, these two zones were selected for local MCR-ALS analysis. For this reason, we have decided to perform local MCR-ALS in the epithelium and connective tissues zones. First, column-wise augmented data matrices formed by the pixel spectra located in the interesting tissue zones are built (see Fig. 3). Four multiset structures were constructed: two for the epithelium zone (one for pixel spectra of non-inflamed epithelium, related to clusters *cn* and *dn* in Fig. 5a and the second for pixel spectra of the inflamed epithelium, related to cluster *di* in Fig. 5b), and two for the connective tissue (one for pixel spectra of non-inflamed tissue, related to cluster *bn* in Fig. 5a and one for pixel spectra of inflamed tonsils, related to cluster *ei* in Fig. 5b). Local MCR-ALS was performed on each one of these four multisets using the same constraints described in Section 3.1.

Local MCR-ALS resolution provides distribution maps and pure spectra of the contributions present in the analyzed tissue zones. Since the number of resolved contributions was always equal or lower than three, the distribution maps obtained for each image are displayed in a single red, green and blue (RGB) image that yields a pseudo-color map with mixing colors indicating the intensity values of each MCR contribution in each pixel (see Fig. 6). This means that red, green and blue colors can be observed or mixtures of them, in pixels where MCR contributions overlap (e.g., magenta pixels mean that blue and red contributions are mixed in that particular part of the sample). In cases where only two components are present, only the red and green channels are used to compose the final image. Resolved spectra and related distribution maps have the same color. Pure resolved spectra contain better defined spectral bands than MCR on the complete

images, which allow identifying and characterizing health conditions and subregions within the tissue.

Fig. 6 shows the results of local MCR-ALS analyses performed on the multiset structures coming from non-inflamed (Fig. 6a) and inflamed epithelium clusters (Fig. 6b). Left plots show the RGB representation of overlaid distribution maps and right plots the related resolved spectral signatures. Three contributions were needed to describe non-inflamed epithelium clusters, while two were modeled for the inflamed epithelium cluster. The different number of resolved components between the local multiset structure of non-inflamed tonsils matches the fact that two clusters were needed to describe the epithelium in the set of healthy samples analyzed, while only one was needed to describe inflamed tonsils. This means that more variability (complexity) in the set of healthy samples could be expected in this case. In this case, we can see essential spectral differences between the resolved spectral signatures of non-inflamed and inflamed tonsil epitheliums (right plots of Fig. 6). Red spectrum of non-inflamed epithelium exhibits three prominent peaks at 1024, 1073 and 1153 cm^{-1} , which are a marker for an increase in the concentration of glycogen in the tissue. This trend seems logical, because glycogen usually accumulates on maturation of epithelial cells [40]. The red spectrum resolved in the inflamed epithelium cluster lacks the three bands above and, instead, presents an increase at 1087 cm^{-1} , this being the most noticeable difference between spectra of Fig. 6a that could be regarded as an additional indicator of inflammatory response. The blue (*Ilen*) and green (*lei*) spectra of the non-inflamed and inflamed tonsils are similar. They present low pronounced bands between region 2800–3100 and bands at 1235 cm^{-1} and 1082 cm^{-1} . The third pure constituent (*IIlen*) of the non-inflamed tonsils seems to be located between the epithelium and connective tissue zones because it presents characteristics bands of connective tissue, i.e., 1230 cm^{-1} , and pronounced C-H stretching contributions between 2800 and 3100 cm^{-1} , typical for the epithelium proteins.

Afterwards, local MCR-ALS was carried out on the connective tissue cluster for non-inflamed and inflamed tonsils. Three contributions for the diffuse lymphoid cluster of non-inflamed tonsils and two for the connective cluster of inflamed tonsils were resolved. Connective tissue is a group of tissue types that differ significantly in form and function from each other, yet share common features in their development and structural organization [7]. In our case, there is more variability in connective tissues among non-inflamed tonsils, for this reason more MCR contributions are needed in order to describe completely this tissue zone. In the RGB maps (left plots Fig. 7a), a new red subregion associated with lymphatic nodules can be seen. Lymphatic nodules are a small collection of lymphoid tissues usually located in the loose connective tissue beneath epithelium tissue. Through the morphology of the tonsils (especially tonsil 1 and 3) we can easily relate the lymphoid nodules to the new red subregion. We can also confirm these lymphoid nodules because they are located within the blue region, which correspond to the connective tissue since it presents the characteristic spectral bands described before in Section 4.2. The lymphatic nodules are not well defined in the RGB maps in the connective tissue of inflamed tonsils (see left plots of Fig. 7b). Observing the resolved pure spectra associated (see right plots of Fig. 7b), red spectrum presents also characteristic spectral bands of connective tissue while green spectrum shows an increase at 1082 cm^{-1} which is an indicator of inflammation [10]. Besides, the spatial structure of subregions of the tissue is blurred; this fact is also a signal of inflammation response.

Local MCR-ALS performed in regions of interest of tonsil tissues provided by multiset KMC analysis of MCR scores coming from a MCR-ALS analysis on complete images has been proven to

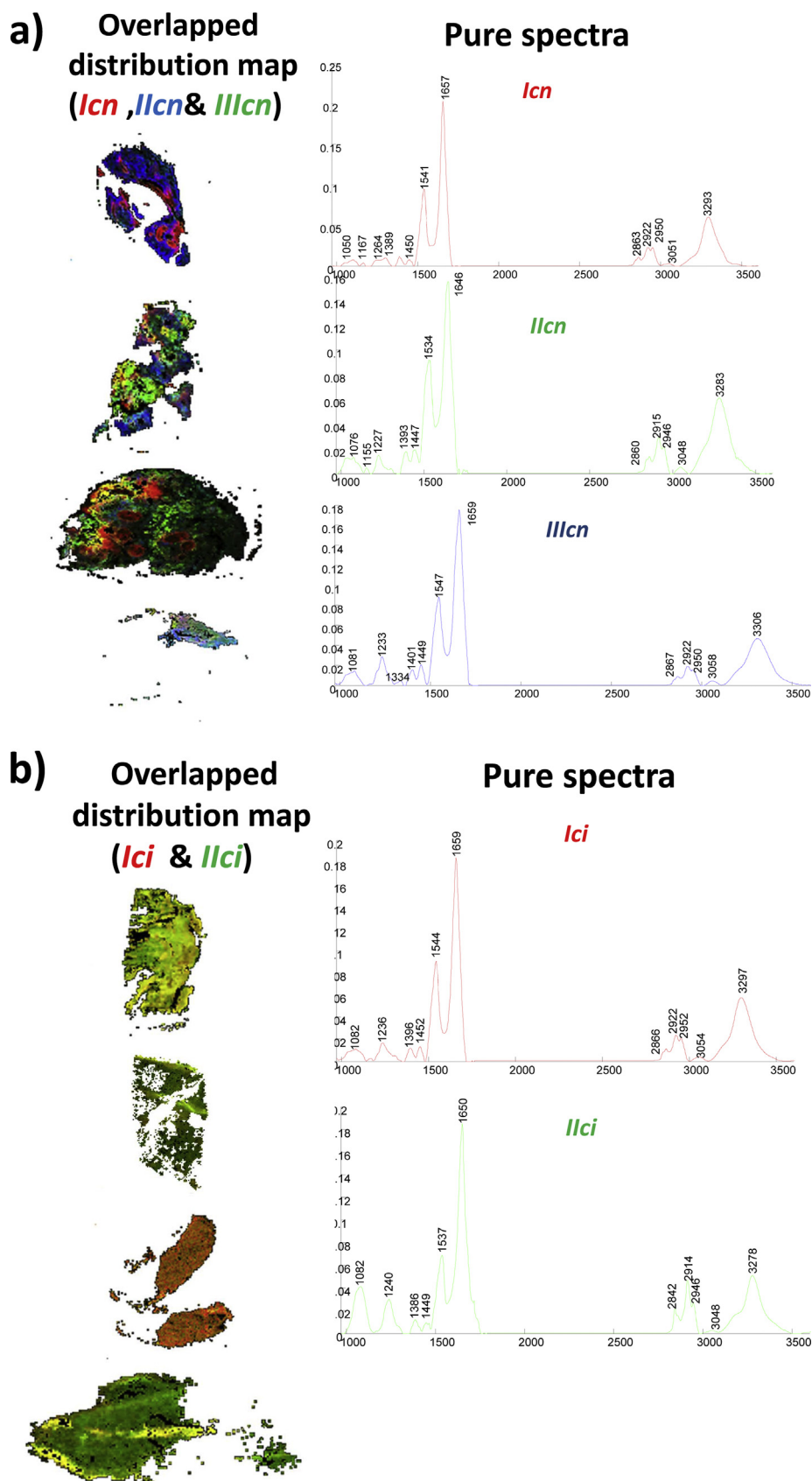


Fig. 7. (a) Local MCR-ALS resolution results of multiset structure formed by non-inflamed tonsils on connective tissue. Left plots: representation of distribution maps of tissue subregions overlapped into a red, green and blue (RGB) image. Right plots: related pure spectra. (b) Local MCR-ALS resolution results of multiset structure formed by inflamed tonsils on connective tissue. Left plots: overlapped distribution maps into a red, green and blue (RGB) image (only red and green channels are used). Right plots: related pure spectra. (For interpretation of the references to color in this figure legend as well as in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

distinguish subregions within biological tissues and to provide spectral features associated with inflammation responses.

5. Conclusions

The general strategy combining multiset resolution and segmentation has been shown to work for the characterization of biological tissue types and for a better differentiation between tissue subregions or between tissues in different health conditions based on the use of FTIR images.

Once more, MCR-ALS multiset analysis on full images has proven to be a powerful tool to provide consistent spectral basic spectral signatures to define biological elements common to a series of samples and to provide MCR scores for subsequent segmentation analysis.

For the first time, multiset KMC segmentation analysis has been used on the resolved MCR scores from multiset image analysis of different tissue samples. The idea of multiset analysis, transferred to image segmentation, has allowed distinguishing among tissue clusters present in all samples and, therefore, interesting for its diagnostic value, and sample-specific clusters, that reflect and enclose the natural biological variability among samples. The results of image segmentation distinguish the different tissue types and their spatial distribution could be eventually compared with the outcomes of standard histopathological staining protocols.

The clusters with diagnostic value, i.e., those common to all images in the same health conditions, can be further analyzed in a separate way by local multiset MCR-ALS analysis. This kind of analysis, which only works on the pixel spectra of the cluster of interest, allows for a finer differentiation of the tissue subregions and a better comparison of results between samples in different health conditions.

The strategy proposed was shown to work for a case study of inflamed and non-inflamed tonsil tissue samples, but can certainly be adopted in a general case of FTIR biological images related to different tissue subregions and health conditions. The two key ideas behind the approach are: (a) keeping the concept of multiset in the full data analysis workflow, to be able to separate the information common to all samples and essential to interpret general behavior trends, from information linked solely to the sample-to-sample biological variability and (b) keeping the sequence resolution on complete images/segmentation/local resolution because the final local step, focused on very specific tissue regions, can enormously help to see the subtle FTIR spectral differences associated with tissue subregions.

Acknowledgements

A. de Juan, S. Piqueras and R. Tauler acknowledge financial support from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP/2007-2013)/ERC Grant Agreement N. 32073 (CHEMAGEB project). They also belong to the network of recognized research groups by the Catalan government (2014 SGR 1106).

References

- [1] M.E. Perry, The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance, *J. Anat.* 185 (1994) 111–127.
- [2] H. Nave, A. Gebert, R. Pabst, Morphology and immunology of the human palatine tonsil, *Anat. Embryol.* 367–373 (2001) 2001.
- [3] T. Karchev, P. Kabakchiev, M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil, *Rhinology* 22 (1984) 201–210.
- [4] C. Krafft, V. Sergio, Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues, *Spectroscopy* 20 (2006) 195–218.
- [5] A. Boskey, N. Pleshko Camacho, FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage, *Biomaterials* 28 (2007) 2465–2478.
- [6] R.A. Shaw, J.R. Mansfield, S.P. Rempel, S. Low-Ying, V.V. Kupriyanov, H.H. Mantsch, Analysis of biomedical spectra and images: from data to diagnosis, *J. Mol. Struct. Theochem.* 500 (2000) 129–138.
- [7] C. Krafft, Vibrational spectroscopic imaging of soft tissue, in: R. Salzer, H.W. Siesler (Eds.), *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, WILEY, 2009, 2015, pp. 113–143.
- [8] M. Diem, P.R. Griffiths, J.M. Chalmers, *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Wiley&Sons, Chichester, West Sussex, 2008.
- [9] P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann, M. Diem, Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis, *Biochim. Biophys. Acta* 1688 (2004) 176–186.
- [10] W. Steller, J. Eienkel, L.-C. Horn, U.-D. Braumann, H. Binder, R. Salzer, C. Krafft, Delimitation of squamous cell cervical carcinoma using infrared microspectroscopic imaging, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 145–154.
- [11] D.C. Fernandez, R. Bhargava, S.M. Hewitt, I.W. Levin, Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 469–474.
- [12] H. Fabian, N.A.N. Thi, M. Eiden, P. Lasch, J. Schmitt, D. Naumann, Diagnosing benign and malignant lesions in breast tissue sections by using IR-microspectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 874–882.
- [13] A. Benard, C. Desmedt, M. Smolina, P. Szternfeld, M. Verdonck, G. Rouas, N. Kheddoumi, F. Rothé, D. Larsimont, C. Sotiriou, E. Goormaghtigh, Infrared imaging in breast cancer: automated tissue component recognition and spectral characterization of breast cancer cells as well as the tumor microenvironment, *Analyst* 139 (2014) 1044–1056.
- [14] B.R. Wood, L. Chiriboga, H. Yee, M.A. Quinn, D. McNaughton, M. Diem, Fourier transform infrared (FTIR) spectral mapping of the cervical transformation zone, and dysplastic squamous epithelium, *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 59–68.
- [15] A. de Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, L. Duponchel, R. Tauler, Chemometric tools for image analysis, in: R. Salzer, H.W. Siesler (Eds.), *Infrared and Raman Spectroscopy Imaging*, Wiley-VCH, 2009, 2015, pp. 65–109.
- [16] M. Diem, A. Mazur, K. Lenau, J. Schubert, B. Bird, M. Miljković, C. Krafft, J. Popp, Molecular pathology via IR and Raman spectral imaging, *J. Biophotonics* 6 (2013) 855–886.
- [17] M. Hedegaard, C. Matthäus, S. Hassing, C. Krafft, M. Diem, J. Popp, Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging, *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) 1249–1260.
- [18] M. Miljković, T. Chernenko, M.J. Romeo, B. Bird, C. Matthäus, M. Diem, Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets, *Analyst* 135 (2010) 2002–2013.
- [19] A. Lattermann, C. Matthäus, N. Bergner, C. Beileites, B.F. Romeike, C. Krafft, B.R. Brehm, J. Popp, Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging, *J. Biophotonics* 6 (2013) 10–21.
- [20] T.N. Tran, R. Wehrens, L.M.C. Buydens, Clustering multispectral images: a tutorial, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 77 (2005) 3–17.
- [21] C. Krafft, D. Codrich, G. Pelizzo, V. Sergio, Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study, *J. Biophotonics* 1 (2008) 54–69.
- [22] S. Piqueras, L. Duponchel, M. Offroy, F. Jamme, R. Tauler, A. de Juan, Chemometric strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images: a single-cell case study, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6303–6311.
- [23] S. Piqueras, L. Duponchel, R. Tauler, A. de Juan, Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares, *Anal. Chim. Acta* 705 (2011) 182–192.
- [24] Y. Pu, W. Wang, Y. Yang, R.R. Alfano, Native fluorescence spectra of human cancerous and normal breast tissues analyzed with non-negative constraint methods, *Appl. Opt.* 52 (2013) 1293–1301.
- [25] S. Lloyd, Least squares quantization in PCM, *IEEE Trans. Inf. Theory* 28 (2015) 129–137.
- [26] T.N. Pappas, An adaptive clustering algorithm for image segmentation, *IEEE Trans. Sig. Process.* 40 (1992) 901–914.
- [27] R. Tauler, A.S. And, B. Kowalski, Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution, *J. Chemom.* 9 (1995) 31–58.
- [28] R. Tauler, Multivariate curve resolution applied to second order data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133–146.
- [29] R. Tauler, M. Maeder, A. de Juan, Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier, 2009, 2015, pp. 473–506.
- [30] P. Lasch, Spectral pre-processing for biomedical vibrational spectroscopy and microspectroscopic imaging, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117 (2012) 100–114.
- [31] C. Krafft, R. Salzer, G. Soff, M. Meyer-Hermann, Identification of B and T cells in human spleen sections by infrared microspectroscopic imaging, *Cytometry. A* 64 (2005) 53–61.
- [32] P.H.C. Eilers, Parametric time warping, *Anal. Chem.* 76 (2004) 404–411.
- [33] A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 70–79.
- [34] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101–110.
- [35] A. de Juan, R. Tauler, Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163–176.
- [36] W. Windig, J. Guilment, Interactive self-modeling mixture analysis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432.
- [37] R. Bro, S. de Jong, A fast non-negativity-constrained least squares algorithm, *J. Chemom.* 11 (1997) 393–401.

- [38] J. MacQueen, Some methods for classification and analysis of multivariate observations, *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability: Statistics 1* (1967) 287–297.
- [39] M. Jackson, L.-P. Choo, P.H. Watson, W.C. Halliday, H.H. Mantsch, Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 1270 (1995) 1–6.
- [40] L. Chiriboga, P. Xie, H. Vigorita, V. Yee, D. Zarou, D. Zakim, M. Diem, Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix, *Biospectroscopy* 4 (1998) 47–53.

5.3.1 Combinació d'anàlisi multiconjunt de resolució i segmentació per a l'estudi d'imatges hiperespectrals de teixits biològics

Un dels camps on més ha incidit el desenvolupament de les imatges hiperespectrals ha estat el biomèdic, on la combinació de les imatges adquirides i el tractament quimiomètric adequat s'han convertit en una eina complementària per a l'avaluació del diagnòstic clínic. En aquest bloc es mostra la capacitat de les imatges FT-IR combinades amb eines quimiomètriques per a la identificació dels diferents tipus de teixits biològics presents en les amígdals i per a la descripció de les diferències espectrals i morfològiques entre amígdals inflamades i no inflamades. L'estratègia que es proposa consta de tres passos i és adaptable de manera general per a qualsevol estudi basat en la comparació d'imatges hiperespectrals de dues poblacions de mostres. Els tres passos seguits en la seqüència de l'anàlisi de dades s'esmenten a continuació:

1. Resolució de les estructures multiconjunt formades per imatges de la mateixa població (mateix estat patològic) mitjançant el mètode MCR-ALS.
2. Segmentació conjunta de tots els perfils de concentració resolts associats a les imatges analitzades en cadascuna de les poblacions d'interès.
3. Resolució dels píxels de cada classe de segmentació d'interès per a cadascuna de les dues poblacions d'imatges.

Les imatges pertanyen a dues poblacions diferents de mostres d'amígdals, la de control i la que presenta la patologia d'inflamació. La seqüència d'anàlisi de dades s'aplica separatament per a cadascuna de les dues poblacions d'imatges per tal d'arribar a identificar les petites diferències espectrals entre el teixits biològics d'ambdós tipus de mostres (vegeu esquema de l'estratègia aplicada a la figura 5.3.1.1).

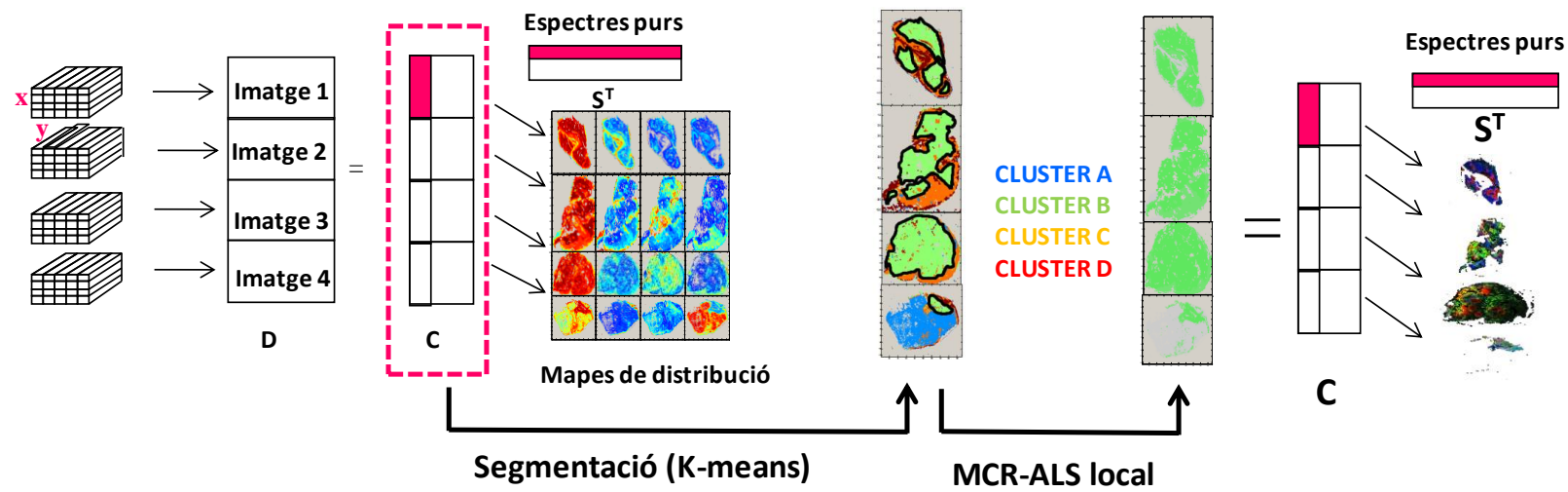


Figura 5.3.1.1 Representació gràfica de la combinació de mètodes de resolució i segmentació per a l'anàlisi d'imatges hiperespectrals de teixits biològics.

El primer pas de l'estudi es basa en l'anàlisi multiconjunt per a cadascuna de les poblacions d'imatges completes. Aquest primer pas de resolució permet la identificació dels components biològics més dominants en cada cas.

Seguint els passos ja descrits del mètode de resolució MCR-ALS, es van descriure quatre contribucions per al sistema format per les imatges de les amígdals no inflamades i cinc contribucions per al sistema format per les amígdals inflamades. L'anàlisi MCR-ALS es va dur a terme en amígdals control (D_n) i inflamades (D_i), respectivament.

$$D_n = [D_{n1}; D_{n2}; D_{n3}; D_{n4}] = [C_{n1}; C_{n2}; C_{n3}; C_{n4}] S_n^T = C_n S_n^T$$

$$D_i = [D_{i1}; D_{i2}; D_{i3}; D_{i4}] = [C_{i1}; C_{i2}; C_{i3}; C_{i4}] S_i^T = C_i S_i^T$$

Durant el procés d'optimització es van introduir les restriccions de no-negativitat en els perfils de concentracions i d'espectres purs i la normalització dels espectres. Respecte al conjunt d'imatges de les amígdals inflamades es va realitzar una segona resolució perquè es va observar l'absència d'un component en algunes de les imatges de l'estructura multiconjunt. Així doncs, que es va introduir informació sobre la correspondència d'espècies en la segona resolució, la qual cosa va millorar la definició i qualitat dels resultats de l'anàlisi de les imatges de les amígdals inflamades.

L'anàlisi conjunta MCR-ALS proporciona signatures espectrals més ben definides, vàlides per a tota la població d'imatges analitzades conjuntament i mapes de distribució per a la descripció completa dels dos tipus de mostres biològiques; en aquest cas, per al conjunt d'amígdals no inflamades i inflamades. Cal aclarir que una contribució MCR-ALS pot estar associada a una espècie química pura, tal i com s'ha vist clarament en l'anàlisi individual del càlcul renal, o pot correspondre a una part de la mostra amb una signatura espectral consistent, com per exemple, la relacionada amb un tipus de teixit biològic¹. No obstant això, en aquest últim cas, un teixit biològic pot estar descrit per una única contribució MCR o per una mescla de contribucions, en cas que la complexitat i heterogeneïtat natural del teixit així ho requereixi. En l'anàlisi de resolució de les amígdals, ambdues poblacions de mostres (amígdals normals i inflamades) presenten una contribució MCR-ALS relacionada amb proteïnes associades al teixit epitelial. El teixit epitelial es caracteritza per les seves bandes espectrals a 1041, 1081 i 1105 cm⁻¹

corresponents als grups funcionals dels pèptids poliglicosilats que es troben en la mucosa produïda per les glàndules epitelials ². Els mapes de distribució mostren que les proteïnes associades al teixit epitelial es troben distribuïdes al voltant de les amígdals (vegeu figura 4a i 4b de l'article 5.3I). El teixit connectiu és l'altra de les contribucions modelades en ambdues poblacions de mostres. Aquest tipus de teixit es caracteritza per la banda espectral a 1237 cm^{-1} corresponent a l'amida III i es troba generalment distribuït per gran part de l'amígdala, majoritàriament per sota del teixit epitelial, tot i que també hi ha zones en comú amb el teixit epitelial. A més, en el conjunt d'imatges d'amígdals no inflamades, una contribució és assignada a proteïnes associades a l'hemoglobina on la banda espectral de l'amida I (1641 cm^{-1}) i de l'amida II (1544 cm^{-1}) presenten intensitats similars. L'hemoglobina no s'associa a un tipus de teixit biològic particular però s'observa generalment distribuïda en el teixit connectiu. Per altra banda, en l'estructura multiconjunt formada per les imatges de les amígdals inflamades, algunes de les mostres indiquen la presència de fosfolípids, identificats per la intensa banda d'absorció entre 2825 i 2950 cm^{-1} corresponent als grups CH_2 i CH_3 dels àcids grassos (vegeu figura 4a i 4b de l'article 5.3.I).

L'anàlisi de resolució conjunta per al conjunt d'imatges completes de les seccions d'amígdals inflamades i no inflamades descriu les contribucions biològiques més rellevants per a cadascuna de les poblacions. Els mapes de distribució i els espectres resolts proporcionen informació biològica rellevant capaç de diferenciar entre els diferents tipus de teixits. Els resultats de l'anàlisi de resolució multiconjunt són consistents entre mostres, ja que tots els mapes de distribució d'una contribució MCR de l'estructura multiconjunt estan associats a una mateixa signatura espectral.

El segon pas de l'estratègia d'anàlisi consisteix en la segmentació multiconjunt de cadascuna de les poblacions d'imatges, prenent com a informació de partida els mapes de distribució resolts en el pas anterior. El potencial de l'anàlisi de segmentació a partir de l'ús dels perfils de concentració resolts mitjançant el mètode MCR-ALS s'ha demostrat en l'article 5.1-I. De manera anàloga, la segona etapa d'aquesta nova estratègia d'anàlisi es beneficia dels avantatges anteriorment exposats, i afegeix els associats al mode d'anàlisi multiconjunt. Així la segmentació multiconjunt dóna consistència a les classes definides dins d'una població i permet diferenciar classes comunes a totes les mostres, que mostren trets generals de comportament i poden ser usats en diagnòstic,

i de classes específiques d'alguna mostra en particular dins de la població, que responen únicament a la variabilitat natural d'aquest tipus de mostres.

A partir dels perfils de concentració resolts de les amígdals no inflamades i les inflamades (C_n i C_i) es va dur a terme la segmentació conjunta per a cadascuna de les poblacions de mostres. La figura 5.3.1.2 mostra els mapes de segmentació per al conjunt d'imatges d'amígdals no inflamades i inflamades. Els mapes de segmentació resolts per al conjunt d'amígdals no inflamades presenten tres classes (b_n, c_n i d_n) comunes a totes les mostres i un clúster específic per a la imatge de la tonsil·la 4 (a_n). Les classes c_n i d_n estan relacionades amb el teixit epitelial no inflammat, ja que cobreixen tota la superfície de l'amígdala i la classe b_n , situada sota l'epiteli, correspon al teixit connectiu. Els mapes de segmentació de les imatges de les amígdals inflamades presenten les classes a_i, b_i, d_i i e_i comunes a totes les mostres i la classe c_i , identificada en les imatges de les tonsil·les 5 i 7, específica sobretot per a la imatge de la tonsil·la 5 on es troba majoritàriament. La classe c_i s'associa amb la presència de fosfolípids. Al voltant de la superfície de l'amígdala es troba distribuïda la classe d_i associada al teixit epitelial inflammat i per sota es troba la classe e_i relacionada amb el teixit connectiu. L'existència de classes específiques associades a algunes mostres és deguda a la variabilitat natural de les mostres biològiques i a la diferència entre les seccions de cadascuna de les imatges de les amígdals adquirides.

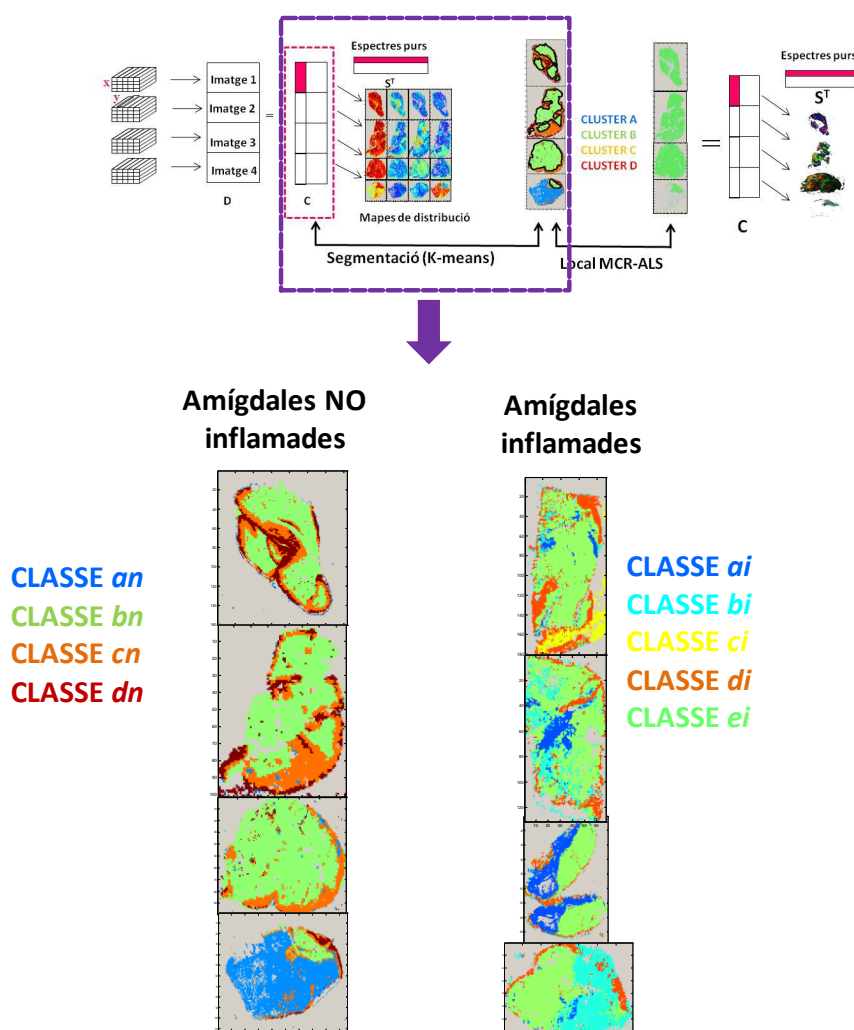


Figura 5.3.1.2 En la part superior de la figura, etapa de segmentació conjunta per a les poblacions d'imatges d'amígdales no inflamades i inflamades. En la part inferior, els mapes de segmentació per a les imatges de la població de tonsil·les no inflamades i per a la població d'imatges de tonsil·les inflamades.

El mètode de segmentació multiconjunt ajuda a definir les classes de teixits comuns i específics en les mostres de cada població. En aquest punt, es coneixen els diferents tipus de teixits biològics que descriuen l'estat patològic de cada tipus d'imatge analitzada. Des del punt de vista espacial (morfològic), s'observa més desordre en els diferents tipus de teixits biològics en el conjunt d'imatges formades per les amígdales inflamades, la qual cosa pot ser un efecte associat a la malaltia. De tota manera són necessaris resultats addicionals que permetin identificar des del

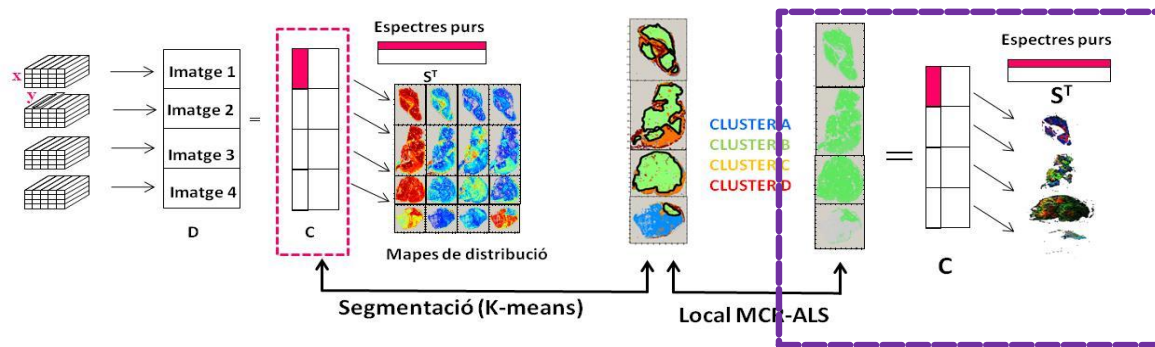
punt de vista de la composició, les petites diferències entre les dues poblacions de les mostres per al bon diagnòstic clínic.

El tercer i últim pas de l'estratègia d'anàlisi proposada es basa en la resolució conjunta de zones específiques de les imatges per a cadascuna de les dues poblacions de les mostres. Les regions d'interès seleccionades en les imatges corresponen a una o més classes de segmentació comunes a totes les imatges segmentades de la mateixa població, la qual cosa indica que es tracten de tipologies de teixit associables a un estat patològic particular. S'exclouen d'aquesta anàlisi de resolució, classes específiques d'una mostra particular, que són únicament atribuïbles a la variabilitat biològica entre mostres (vegeu última part de l'esquema de la figura 5.3.1.1).

L'anàlisi local mitjançant el mètode MCR-ALS permet una millor definició i resolució dels components presents en el teixit biològic d'interès. L'anàlisi de resolució local es va aplicar a l'epiteli, teixit de clar interès en patologies d'inflamació, ja que cobreix tota la superfície de la tonsil·la formant una primera línia de defensa contra els antígens, fet que proporciona informació interessant per al diagnòstic. Per a tal fi, es va construir una estructura multiconjunt seleccionant els píxels agrupats en les classes c_n i d_n per a la població d'imatges de les amígdals no inflamades. Anàlogament, es van construir una altra estructura multiconjunt amb píxels de la classe d_i per a població d'imatges de les amígdals inflamades.

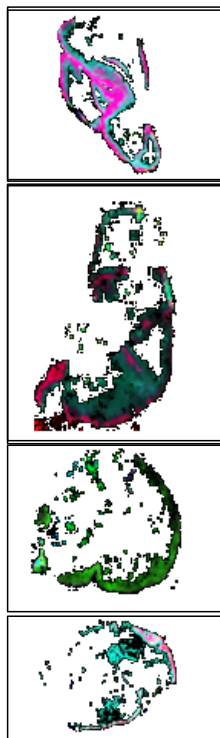
En l'anàlisi de l'epiteli es van determinar tres components per a la resolució local del teixit no inflammat i dos per a la del teixit inflammat. Atès que el nombre de components en ambdues anàlisis és igual o inferior a tres, els mapes de distribució han estat representats en un sol mapa codificat en escala RGB; és a dir, associant un dels tres canals que compona una imatge RGB (vermell, verd o blau) a cada constituent i superposant-los en un únic mapa de distribució global. Quan el sistema està descrit per dos constituents, tan sols s'han emprat els canals vermell i verd. La representació dels mapes de distribució en una sola imatge RGB permet visualitzar més fàcilment la distribució de cadascun dels constituents en la regió analitzada i la superposició que presenten. En la figura 5.3.1.3 s'observen els resultats de la resolució local per a cadascuna de les poblacions de mostres mitjançant l'anàlisi conjunta MCR-ALS.

Aquesta figura també mostra diferències entre els espectres resolts de l'epiteli no inflammat i inflammat. L'espectre pur vermell procedent de la resolució del teixit epitelial no inflammat es caracteritza per tres bandes a 1024, 1073 i 1153 cm^{-1} , que assenyalen l'augment de la concentració de glicogen en el teixit. Aquest tret té lògica, ja que el glicogen habitualment s'acumula durant la maduració de les cèl·lules epitelials³. En canvi, l'espectre vermell resolt per al teixit epitelial inflammat presenta un banda d'absorció a 1087 cm^{-1} , però no hi ha cap indici de les bandes associades a la contribució del glicogen. El glicogen és un indicador característic de la patologia, ja que permet diferenciar entre les dues poblacions de mostres. Aquesta darrera etapa de resolució de regions localitzades de teixit és essencial per a definir amb més precisió les diferències espectrals i morfològiques entre les dues poblacions d'imatges amb diferents patologies.

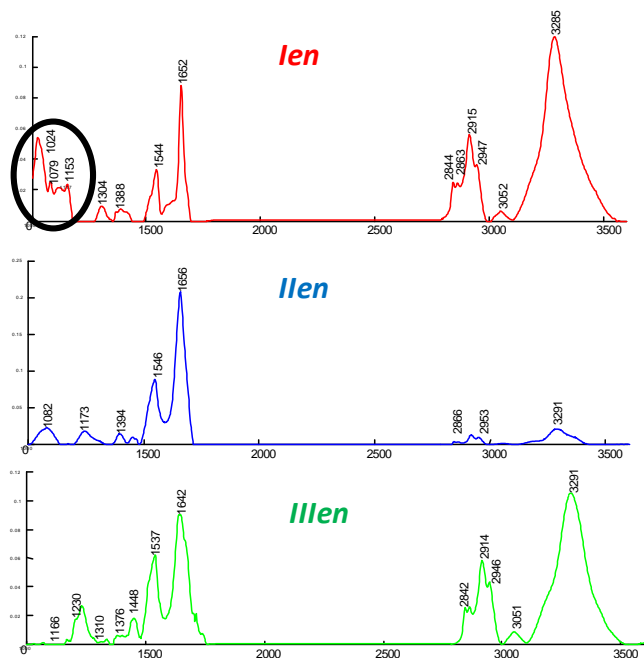


a)

Mapes superposats de
distribució
(*len*, *llen* & *lllen*)



Espectres purs



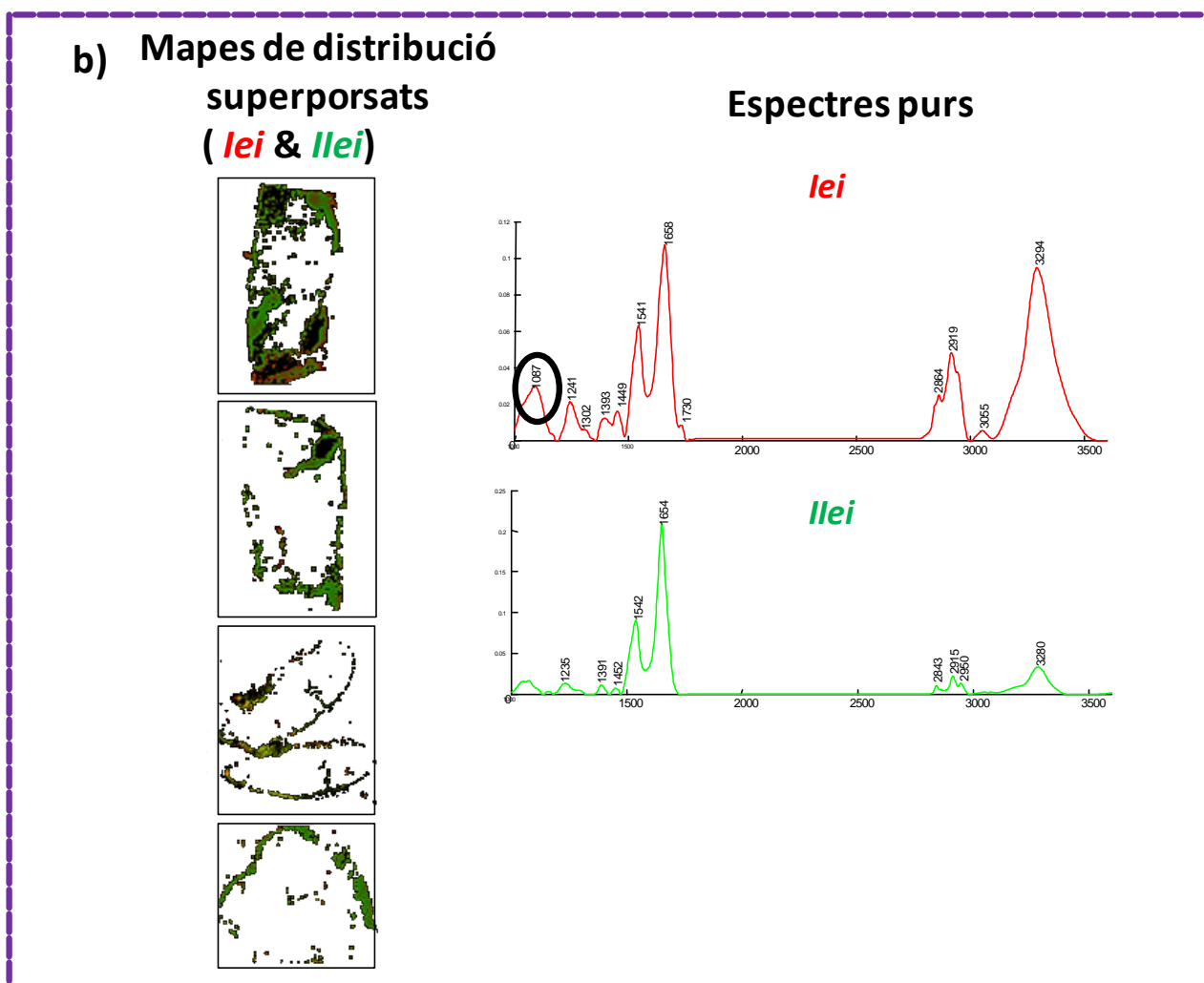


Figura 5.3.1.3 En la part superior de la figura, etapa associada a l'anàlisi de resolució local del teixit epitelial per a cadascuna de les poblacions d'imatges de les tonsil·les no inflamades i de les tonsil·les inflamades. **a)** Mapes de distribució RGB i espectres purs dels components del teixit epitelial no inflammat. **b)** Mapes de distribució RGB i espectres purs dels components del teixit epitelial inflammat.

El mateix procediment de resolució local es va dur a terme en el teixit connectiu present en les amígdales inflamades i no inflamades, atès que és un teixit que està amb contacte directe amb l'epiteli i pot aportar informació clínica rellevant. Es van determinar tres components per al conjunt de les regions associades al teixit connectiu no inflammat i dos components per a les regions associades al teixit connectiu inflammat. Una nova subregió ha estat clarament diferenciada dins el teixit connectiu no inflammat relacionada amb la presència de nòduls limfàtics. Els nòduls limfàtics no han estat identificats de forma clara dins el teixit connectiu

inflamat, ja que la distribució dels components es troba més desordenada i això podria ser un símptoma addicional de la inflamació. En aquest cas, la segona etapa de resolució conjunta d'aquests conjunts de regions d'interès associats al teixit connectiu inflammat i no inflammat ha permès la microdiferenciació de teixits dins de les regions.

En general, la resolució conjunta en les regions d'interès de les imatges de cada població proporciona mapes de distribució i espectres d'una qualitat més elevada que els corresponents a la resolució conjunta de les imatges completes. Els espectres resolts procedents de la resolució local contenen bandes espectrals molt ben definides que permeten identificar subregions dins d'un teixit biològic i caracteritzar les petites diferències entre els diferents estats patològics.

5.3.2 Bibliografia

- (1) Felten, J., Hall, H., Jaumot, J., Tauler, R., de Juan, A., and Gorzsás, A. (2015) Vibrational spectroscopic image analysis of biological material using multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). *Nat. Protoc.* 10, 217–40.
- (2) Krafft, C., Codrich, D., Pelizzo, G., and Sergo, V. (2008) Raman and FTIR microscopic imaging of colon tissue: a comparative study. *J. Biophotonics* 1, 154–69.
- (3) Chiriboga, L., Xie, P., Yee, H., Vigorita, V., Zarou, D., Zakim, D., and Diem, M. (1998) Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. *Biospectroscopy* 4, 47–53.

5.4 ANÀLISI CONJUNTA DE DIVERSES IMATGES PROCEDENTS DE DIFERENTS PLATAFORMES ESPECTROSCÒPIQUES

L'últim bloc de resultats se centra en l'anàlisi conjunta d'imatges procedents de diferents plataformes espectroscòpiques. Aquest tipus d'anàlisi permet descriure el sistema de forma completa gràcies a la informació complementària que proporciona cadascuna de les tècniques acoblades i, com a conseqüència, augmenta la qualitat dels resultats finals. Aquest tipus d'anàlisi implica l'ús d'un pretractament per a la fusió de les imatges que asseguri la congruència espacial entre elles i la compensació de diferències de resolució espacial.

5.4.-I Sara Piqueras, Marcel Maeder, Romà Tauler, Anna de Juan. *Data fusion for multitechnique image analysis*. Enviat a Analytical Chemistry.

L'article se centra en la fusió i anàlisi d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques que presenten diferents propietats espacials entre elles. La fusió d'imatges demana realitzar les transformacions espacials adequades de translació i rotació per a tenir imatges congruents i possibilitzar el treball amb imatges amb diferents mides de píxel sense perdre resolució espacial. Aquest treball s'ha dut a terme a partir de l'ús d'imatges d'una mateixa mescla de productes farmacèutics obtingudes amb espectroscòpia Raman i IR mitjà.

5.4.1 Discussió dels resultats

En aquesta secció es presenta una discussió general de l'article d'aquest capítol. Els objectius generals d'aquest treball són:

- Desenvolupar un procediment general per a realitzar transformacions espacials de translació i rotació que assegurin la congruència espacial d'imatges hiperespectrals procedents de diferents plataformes espectroscòpiques.
- Proposar un procediment d'anàlisi conjunta d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques, que permeti preservar la màxima resolució espacial.

DATA FUSION FOR MULTITECHNIQUE IMAGE ANALYSIS

Sara Piqueras¹, Marcel Maeder², Romà Tauler³, Anna de Juan¹.

1. Chemometrics group. Universitat de Barcelona. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
anna.dejuan@ub.edu
2. Dept. Chemistry. The University of Newcastle. Newcastle (Australia)
3. IDAEA-CSIC. Barcelona.

ABSTRACT

Hyperspectral images collected with different spectroscopic techniques can be combined to benefit from complementary information and improve the description of chemical systems. The simultaneous analysis of images collected by different spectroscopic platforms can only be carried out when images are spatially matched with each other (i.e., different pixel sizes should be balanced and translation/rotation/scaling transformations should be done if required).

Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is well suited for multitechnique analysis, it provides distribution maps of each image constituent and the related pure spectra, containing information of all spectroscopic techniques used, provided that suitable image matching preprocessing is carried out.

The main goal of this work is the description of a full chemometric workflow starting by matching image spatial properties and finishing by performing multitechnique image analysis on a data structure that can cope with the different spatial resolution (pixel size) of the coupled techniques. The first step is carried out with a new preprocessing to perform the necessary translation/rotation transformations that uses all pixels in the images to be matched. Multitechnique image analysis is afterwards performed with a new variant of MCR-ALS for incomplete multisets that allows analyzing simultaneously images collected with different spectroscopic techniques without losing spatial resolution and ensuring coherence among the images treated.

Keywords

Data fusion, multitechnique image analysis, MCR-ALS, incomplete multiset analysis.

1. INTRODUCTION

Hyperspectral imaging techniques are widely used in different areas of study such as polymer research, materials science, biomedical diagnostic, pharmaceutical industry, analytical chemistry, process control and environmental analysis¹⁻⁶. The spatial and spectral information linked to these images provides chemical information and detailed knowledge of the distribution of the sample constituents in the surface (or volume) scanned⁶.

Hyperspectral images can be acquired by different techniques, such as IR, Raman, fluorescence or mass spectrometry, among others. The combined information from different techniques is an excellent option to improve the capacity to differentiate among compounds because of the complementary information that they offer and the overall increase in signal to-noise ratio when compared with images obtained a single detection system. Data fusion of different imaging techniques allows a comprehensive description of the sample, but joining images collected from different techniques is complex due their different spatial properties. A matching procedure is necessary to ensure coherence among the fused images and, as a consequence, a correct interpretation of the system studied. Chemometric tools are required for reliable image matching and subsequent multitechnique image analysis.

Image analysis is a field which is undergoing a lot of developments in chemometrics^{1,7-9}. Multivariate resolution (or unmixing) methods are among the most recent tools incorporated to the field of image analysis. Specially, Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares, MCR-ALS, is an iterative resolution method that recovers the underlying spectroscopic bilinear model of the image providing meaningful concentration profiles (folded back into distribution maps) and pure spectra of the image constituents of the raw image measurement¹⁰⁻¹³. MCR-ALS has been proven to adapt particularly well to hyperspectral image resolution due the ease of introduction of external spectral and spatial information about the image and the ability to work with single and multiset image arrangements^{6,14-19}.

Image multiset analysis treats data sets that contain several images. Most image multisets reported are formed by images collected using the same imaging technique. In this case, no preprocessing is needed to join the images, since they only have the spectral mode in common. Multiset structures can also be formed by images collected by different spectroscopic platforms. In this situation, a more complex preprocessing step is required since images must be spatially matched with each other, i.e., different pixel sizes must be balanced and translation/rotation/scaling transformations

should be done if required. Spatial transformations among images are a problem already solved when images have a clear structure with common landmarks, e.g., in remote sensing^{20,21}. It is less straightforward matching chemical images obtained with different techniques because the signal intensity pattern varies among techniques and morphological sample patterns are less clear. Few works about fusion of imaging techniques have been published and they are either based on a qualitative comparison of the information obtained among different techniques or on studies where spatial matching is done from the selection of several equivalent points among images²².

In this work, we propose a full chemometric data analysis workflow to solve the two most usual problems linked to multitechnique image analysis: the search of optimized translation and rotation parameters and the balance of differences in pixel size among images.

Optimizing translation and rotation parameters for image matching often starts by identifying equivalent points among images to be matched. Since chemical images obtained with different techniques do not allow easily for this task, the procedure proposed uses all available pixels in the images to be matched and a SIMPLEX algorithm to find the optimal parameters for the matching problem. Special attention has to be paid to the representative information to be compared among images. Several alternatives, such as global intensity maps, singular values plots obtained from PCA local rank analysis and distribution maps resolved by MCR-ALS individual image analysis have been tested. Information obtained by distribution maps obtained by MCR-ALS has been previously used for postprocessing approaches^{3,16,17,23} and has been proven to be the most consistent for spatial matching compared with other image representations.

Images with the same pixel size only need compensating spatial translation and rotation differences. However, if pixel size among images is different, this difference should also be considered. The straightforward options to solve this problem are either spatially binning the image with highest spatial resolution (downsampling process) and, therefore, lose information or using interpolation for the image with lowest spatial resolution (oversampling process), where the interpolated pixels are an approximation based on neighboring pixels, which does not need to be faithful to the true image behavior. In this paper, the problem arising from differences in spatial resolution has been resolved by using an incomplete multiset data arrangement, which contains spatially matched images from the different techniques with the lowest spatial resolution of the techniques coupled and, in addition, the image of the technique with highest spatial resolution as such. This incomplete multiset can be resolved (unmixed) with a recent version of MCR-ALS

algorithm for incomplete multisets²⁴. As a result, spectral signatures joining information from the different spectroscopic techniques are obtained and a single set of distribution maps with the highest possible spatial resolution is retrieved without the need of oversampling procedures that could incorporate spurious information.

To explore the approach proposed, images of pharmaceutical mixtures of the same sample acquired with different imaging systems (Raman and IR), are submitted to multiset image resolution to enhance the structural description of the image constituents and to improve the spatial description associated taking advantage of the image acquired in the best spatial resolution conditions. This model example can be of practical interest in pharmacy, where the complementary spectral information obtained can help to differentiate more clearly between possible pharmaceutical crystalline products, e.g., with the Raman information, or to improve the modeling of less crystalline components, e.g., with the IR information.

2. EXPERIMENTAL

Sample preparation. The analyzed sample has been a mixture of caffeine, acetylsalicylic acid (ASA) and starch. Caffeine and ASA simulate the APIs of a pharmaceutical formulation and starch acts as an excipient. The mixture of the pharmaceutical components was compacted and compressed by using a diamond cell in order to obtain a compact, flat and translucent sample, necessary for the correct acquisition of the transmission MIR and Raman images on the same sample area. All substances were from Sigma Aldrich (a.r) and were used without further purification.

Infrared imaging. The sample was imaged first by FT-IR using a Nicolet iN10 MX (Thermo). The image size is $38 \times 32 \times 1725$, the first two figures being number of pixels in the x and y directions and the third number of spectral channels. The image was collected in point mapping mode where the pixel size is $15 \times 15 \mu\text{m}^2$. MIR spectra were the result of 64 accumulations, recorded in the spectral range $675\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ with a 4cm^{-1} spectral resolution. Maybe describe here the binning that was used.

Raman imaging. Raman spectra were acquired using a HR800 LabRAM (Horiba Jovin Yvon, Kyoto, Japan). A 532.058 nm laser was used as a light source and the Raman spectra were recorded with a 5s acquisition time in the spectral range going from 100 to 1800cm^{-1} . Raman hyperspectral images have been acquired by point mapping with a pixel resolution of $15 \mu\text{m}$. The image size was $38 \times 32 \times 1745$.

3.DATA ANALYSIS

3.1 Data preprocessing

Signal preprocessing

Signal preprocessing removes spectral variance due to non-chemical information. Raman spectra showed a strong intense band at $\sim 1332\text{ cm}^{-1}$ related to the diamond cell used as a support measurement, which was higher than the rest of the spectrum bands. The signal of the diamond Raman band was replaced by interpolating Raman intensities of neighboring spectral channels, since no other compounds gave signal in this region.

Asymmetric Least-Squares (AsLS) was used to remove the irregular, intense and curved baselines present in Raman and IR spectra^{15,17,25,26}. AsLS is based on a recursive local fitting of the whole spectrum with a baseline obtained by using a Whittaker smoother²⁵. Two parameters are tuned according to the shape of the baseline, one linked to the smoothness (λ) of the fit and one to the penalty imposed to the points giving positive residuals in the fit (p)^{15,25,26}. The use of AsLS requires a significant difference in frequencies among the spectral features and the baseline to be removed. This is the case among the narrow Raman features and the broader fluorescence baseline contribution and the same situation happens when comparing IR features and the broader Mie scattering contribution. Figure 1 shows the global intensity maps of Raman and MIR images of a pharmaceutical mixture and the related AsLS-corrected Raman and MIR spectra.

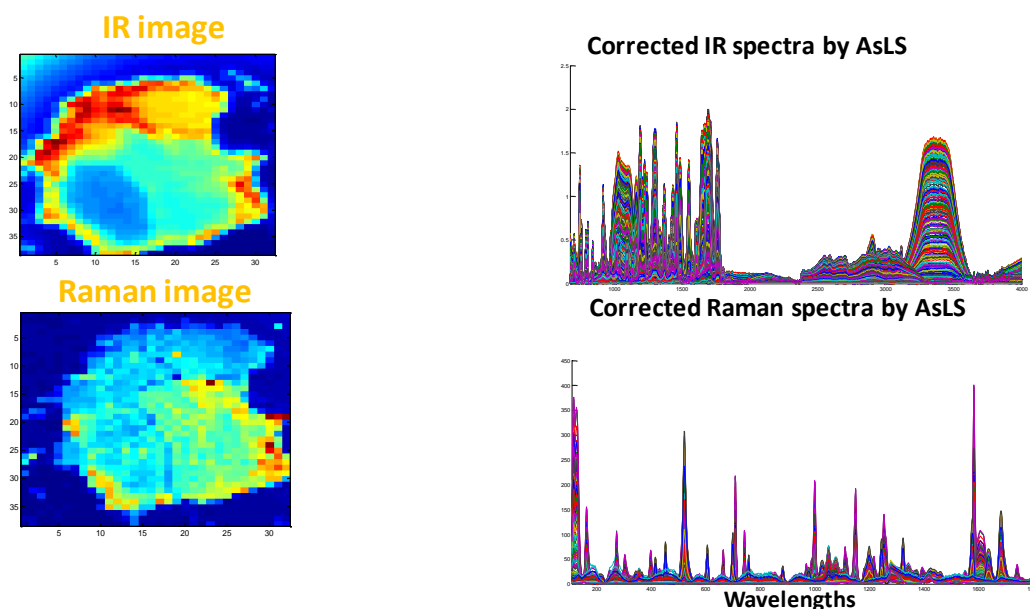


Figure 1. *Left plots:* global intensity maps of MIR and Raman image of pharmaceutical mixture. *Right plots:* MIR and Raman spectra of pharmaceutical image after baseline correction by Asymmetric Least Squares.

Image matching procedure

Images registered on the same sample by different spectroscopic techniques need spatial transformations, i.e., pixel translations in x and y directions and rotations, to be matched. This can be achieved by different procedures, many based on the previous selection of equivalent pixels among images^{22,27}. This selection task is trivial in images with a very clear spatial structure, as remote sensing images or image frames collected with the same technique, but it is not easy for chemical hyperspectral images obtained in different platforms, in which the spatial pattern is not well defined and differences in signal intensity behavior among techniques can hinder this correspondence.

To avoid this problem, the procedure proposed to match images collected from different spectroscopic platforms uses information from all available pixels and works as follows.

First, a reference image and the image to be aligned are selected, taking areas of the same size (nr. of x pixels \times nr. of y pixels). The center of each image is used as the reference point to define the positions of the pixels. Cartesian coordinates will define the x and y positions of each pixel (used to set the translation transformation) and, for each pixel, polar coordinates including the radius and angle from the center of the image to the pixel position will be calculated (to set the rotation transform). Then, initial translation and rotation parameters ($dx, dy, d\alpha$) will be defined by visual

comparison among images. These parameters are optimized minimizing via a SIMPLEX algorithm the sum of squares among the reference image and the image to be aligned as expressed in eq. 1:

$$Ssq(\alpha, dx, dy) = \sum_{i,j} \left(A_{(x_{ref}, y_{ref}, \theta_{ref})IR} - A_{(x+dx, y+dy, \theta+d\alpha)Raman} \right)^2 \quad \text{Eq. 1}$$

Where A means in this case any single data point (intensity, singular value, concentration, see later for explanation) associated with a particular pixel with Cartesian coordinates i, j , during the optimization. Spatial transformations on the image to be aligned generate empty pixel values. These regions with empty pixels are not used in the calculation of the residuals to be minimized (ssq). Once the optimal translation and rotation parameters are found, they are applied to the image to be aligned. In this work, we have compared the matching procedure results obtained when different starting information from the compared images is used, namely, global intensity maps, singular value maps obtained from PCA local rank analysis¹⁸ or information based on the distribution maps obtained by MCR-ALS analysis on each individual image (see section 3.2). Although equation 1 is defined for comparison of a single 2D frame of each image (reference and image to be aligned), whenever the information is formed by a set of analogous frames among images, they can be pairwise compared and equation 1 will be the pooled sum of squares obtained from all performed comparisons. In the latter case, since frames come from the same pair of images, a single set of dx , dy and $d\alpha$ will be optimized.

3.2 Hyperspectral image resolution

The information in an image is structured as a data cube where two dimensions design the pixel coordinates (x and y) and the third the spectral channels. In order to understand the underlying bilinear model related to this measurement, the hyperspectral image cube must be unfolded into a data matrix where the rows contain all the pixel spectra one under the other and the columns design the spectral channels. Now the \mathbf{D} matrix follows the bilinear model shown in eq 2:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq.2}$$

Where \mathbf{D} contains the raw spectra of the image, \mathbf{C} is the matrix of concentration profiles and \mathbf{S}^T contains the pure spectra of image constituents. \mathbf{E} is the matrix of experimental error or

unexplained variance by the MCR model. The distribution maps of each particular image constituent can be obtained folding back each column of the **C** matrix so that the original two-dimensional (2-D) configuration of the sample surface is recovered^{3,6,16,28}. This bilinear model is just the expression of the Beer-Lambert law in matrix form.

Hyperspectral image resolution methods provide the distribution maps and pure spectra related to image constituents from the sole information contained in the raw image measurement^{6,10,11,16,18,29}. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) is an iterative resolution method oriented to recover the bilinear model described in equation 2 through the following basic steps:

1. Determination of the number of components present in the raw image **D** (e.g. by Singular Value Decomposition, SVD)
2. Generation of initial estimates based on the selection of the purest pixel spectra, e.g. by the use of a SIMPLISMA-based method³⁰.
3. Alternating optimization of **C** and **S^T** matrices by least squares under constraints until convergence is achieved.

The operations $\mathbf{C}=\mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ and $\mathbf{S}^T=(\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}$ are involved in the model optimization by alternating least squares (step 3). The parameter used to evaluate the fit quality of the MCR model is the lack of fit defined as follows:

$$\text{LoF (\%)}=100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{i,j}^2}{\sum_{i,j} d_{i,j}^2}} \quad \text{Eq. 3}$$

where d_{ij} is the element of the original data matrix in row i and column j and e_{ij} is the residual obtained from the difference between the element d_{ij} of the original data set and the analogous element obtained from the MCR-ALS model.

MCR-ALS allows introducing constraints during the optimization step. The use of constraints during the process provides chemical meaning to the concentration and pure spectra profiles and decreases the ambiguity effects in the final results obtained. For image analysis, non-negativity constraint has been applied since the concentration profiles as well as the spectroscopic readings of

IR and Raman spectra are, by nature, positive^{10,13,19} Normalization of pure spectra in \mathbf{S}^T has been used to avoid scaling fluctuations in the profiles during optimization.

Often, the simultaneous analysis of several images can be of interest. In this case multiset structures or augmented data matrices \mathbf{D} are built that contain different submatrices \mathbf{D}_i , linked to different individual images. In this work, multiset structures are formed by images obtained with different spectroscopic platforms on the same area surface. In this case, a row-wise augmented data matrix is built putting the spectra of each image next to each other. The construction of multitechnique multiset structures is complex because the pixel mode must be common among images; this means that, images (\mathbf{D}_i) must have the same pixel size and the same spatial orientation for the correct interpretation of the multiset structure. Multitechnique multisets also obey the bilinear model based on the Lambert-Beer Law (see eq2). The decomposition $\mathbf{D}=\mathbf{C}\mathbf{S}^T$ provides a single \mathbf{C} matrix, valid for all images analyzed, and an augmented matrix \mathbf{S}^T formed by as many submatrices as techniques used in the images forming the data set. The profiles of the \mathbf{C} matrix can be refolded conveniently to recover the single set of distribution maps, each related to a particular image constituent (see figure 2a).

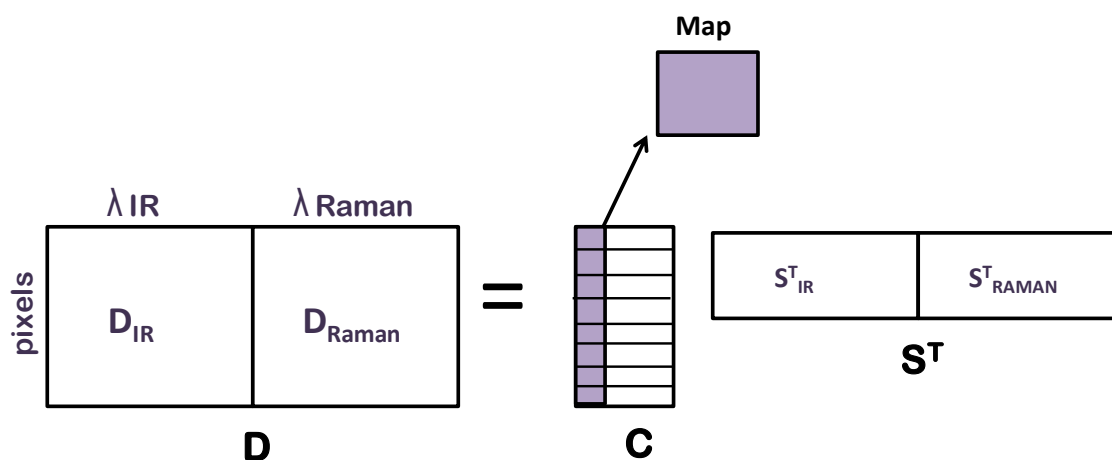


Figure 2. a) Bilinear model coming from the resolution of a complete multitechnique image multiset structure.

Application of the MCR-ALS method to an incomplete multiset structure

Incomplete multiset structures are formed by data sets where some blocks of measurements (related to particular experiments or techniques) do not exist^{31,32} A recent variant of MCR-ALS

algorithm has been developed for the resolution of incomplete (irregularly shaped) multiset structures²⁴. This variant was first designed for the study of environmental data sets. In this work, it has been adapted and used for the first time in image data sets formed by images with different spatial resolution obtained from different techniques. In this case, an irregular data arrangement is formed, as shown in Figure 2b).

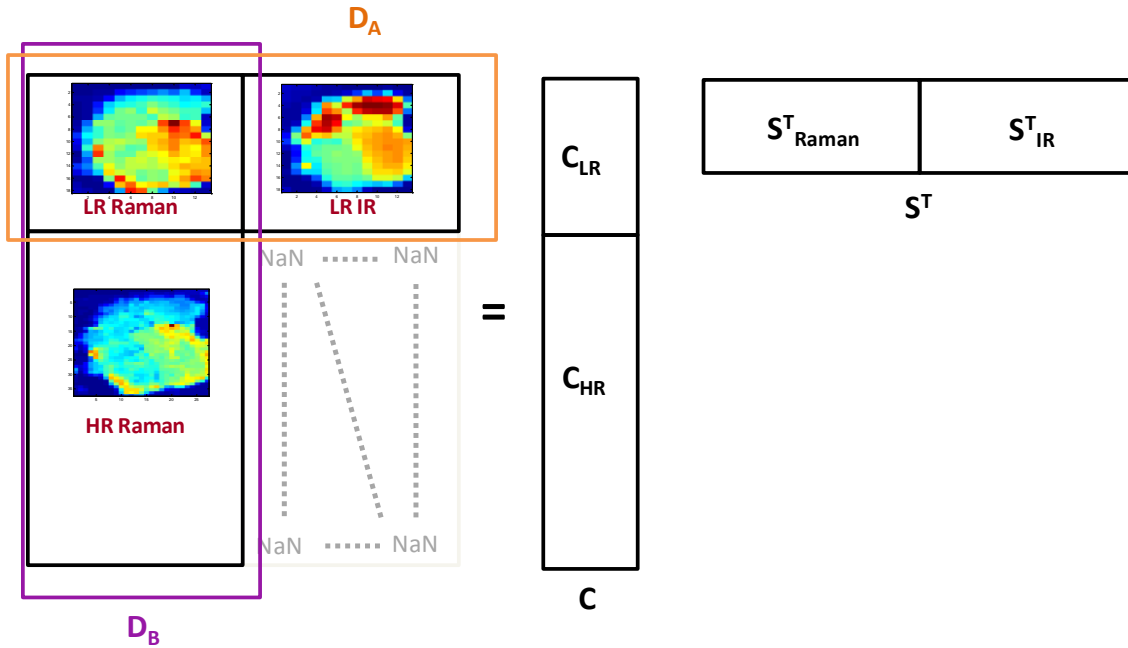


Figure 2.b) Incomplete multiset coming from analyzing images with different spatial resolution and related bilinear model obtained by the variant of the MCR-ALS variant for incomplete multisets.

The incomplete data multiset is formed by two connected complete multisets: D_A , a row-wise augmented data matrix formed by the lowest spatial resolution version of the images of the different techniques appropriately matched, as described in section 3.1, and D_B , a column-wise augmented data matrix formed by the image with the highest spatial resolution and its spatially binned low resolution version.

Bilinear decomposition of these two complete multisets under the suitable constraints is performed simultaneously within the MCR-ALS algorithm providing the bilinear models in equations 4 and 5.

$$D_A = C_{LR} [S^T_{Raman}, S^T_{IR}] \quad \text{Eq.4}$$

$$\mathbf{D}_B = [\mathbf{C}_{LR}, \mathbf{C}_{HR}] \mathbf{S}_{Raman}^T \quad \text{Eq. 5}$$

On one hand, the decomposition of \mathbf{D}_A provides a matrix $[\mathbf{S}_{Raman}^T; \mathbf{S}_{IR}^T]$ which contains spectral information of the different coupled techniques and a single matrix \mathbf{C}_{LR} which contains concentration profiles common for the images with the lowest spatial resolution (see equation 4) . On the other hand, \mathbf{D}_B is decomposed into a single matrix \mathbf{S}_{Raman}^T of pure spectra associated with matrix \mathbf{C} , formed by the two submatrices \mathbf{C}_{LR} and \mathbf{C}_{HR} related to the concentration profiles of the images collected with the same technique with the lowest and original highest spatial resolution (see equation 5). The simultaneous analysis of these two complete multisets gives two least squares error functions, one for each ALS optimization problem. In the proposed ALS algorithm, these two functions are optimized simultaneously (adding the two individual error functions to give a total error function as it is expressed in equation 6).

$$\min(\text{ssq}(\mathbf{D}_A - \mathbf{C}_{LR} [\mathbf{S}_{Raman}^T, \mathbf{S}_{IR}^T]) + \text{ssq}(\mathbf{D}_B - [\mathbf{C}_{LR}, \mathbf{C}_{HR}] \mathbf{S}_{Raman}^T) \quad)$$

Eq. 6

As can be seen in equations 4 and 5, some submatrices are calculated by both multisets \mathbf{D}_A and \mathbf{D}_B . In this work, the submatrices adopted as final results in each iteration are \mathbf{C}_{LR} and \mathbf{S}_{Raman}^T and \mathbf{S}_{IR}^T coming from the \mathbf{D}_A multiset (the complete multitechnique multiset) and \mathbf{C}_{HR} coming from \mathbf{D}_B multiset (joining low and high spatial resolution versions of the image with the highest original resolution). In this case, whenever possible, the solutions coming from the multitechnique multiset have been adopted because of the richer and more diverse information contained in this structure, although other options, e.g., averaging profiles, can be selected for other kind of problems²⁴ In any case, we should not forget that during the ALS optimization, there is a continuous cross-talking between the two ALS optimization problems because of the common error function and the crossed use in each iteration of \mathbf{C}_i or \mathbf{S}_i^T profiles coming from both complete multisets.

As final relevant results from the multitechnique image analysis, spectral signatures of both spectroscopic techniques would be obtained and refolding the profiles of submatrix \mathbf{C}_{HR} into the highest spatial resolution maps would allow us recovering the maximum quality of spatial information without using oversampling procedures that could introduce spurious information.

3.3. Software

Image matching and MCR-ALS routines for incomplete data sets are in-house written MATLAB routines. MCR-ALS for single image analysis and complete multisets has been performed with the GUI freely downloadable at: www.mcrals.info.

4.RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Analysis of a pharmaceutical mixture by Raman and FT-IR images. Single image MCR-ALS analysis.

Before doing a multitechnique analysis, it is a common practice to carry out MCR-ALS separately on each of the Raman and MIR images to be coupled. Preprocessing and MCR-ALS application was performed as explained in section 3.1 and 3.2. MCR-ALS analysis of the MIR image required three components (caffeine, ASA and starch), whereas Raman image needed four components (the three chemical compounds and an additional contribution linked to the residual signal remaining after correction). In both images, resolution was applied under the constraints of non-negativity in concentration profiles and spectra and with spectra normalization of matrix \mathbf{S}^T . Figures 3a and 3b show the final results of distribution maps and pure spectra for Raman and MIR images, respectively.

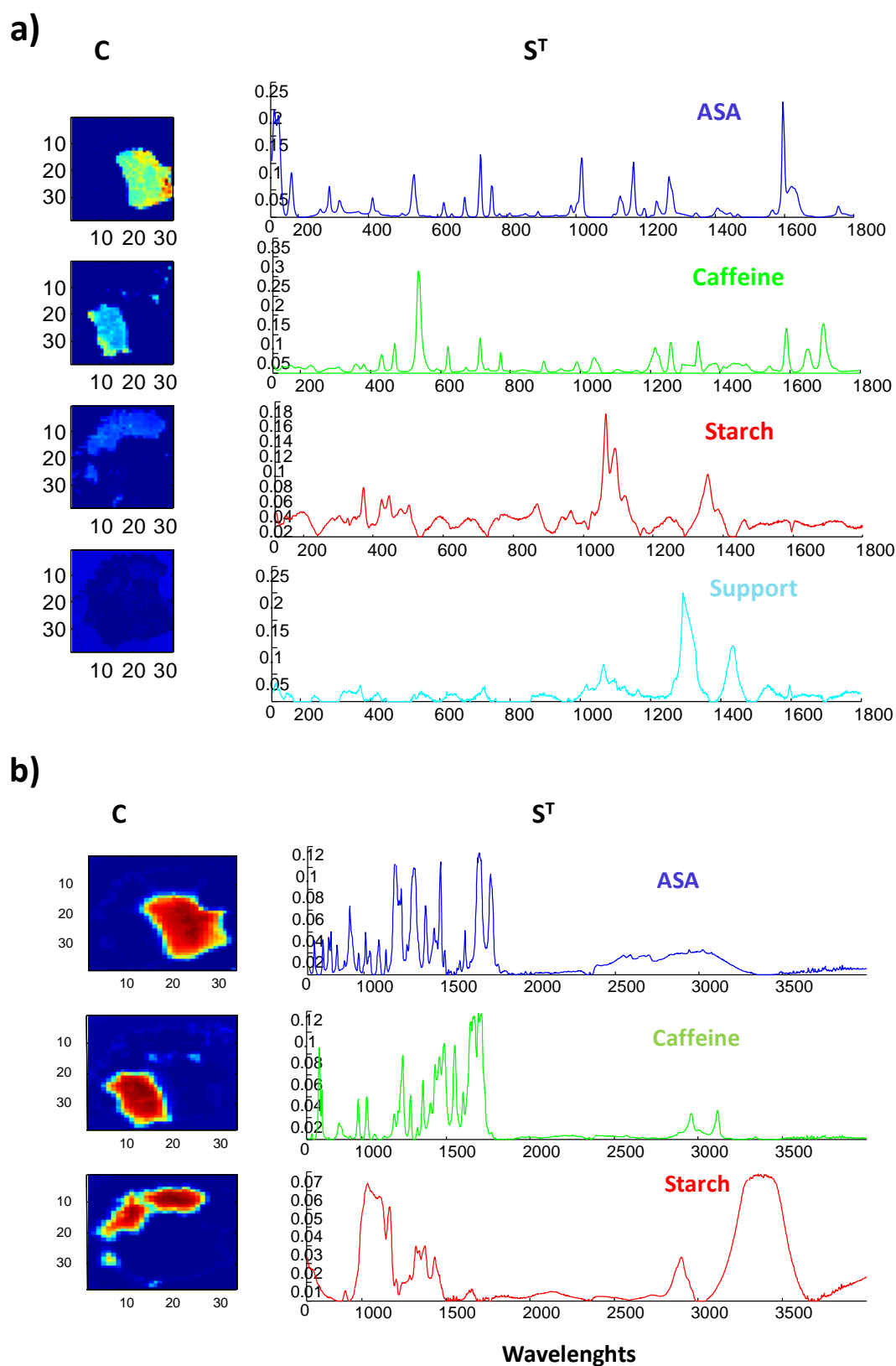


Figure 3. MCR-ALS results obtained from the single Raman and MIR image analysis of pharmaceutical mixture. a) Distribution maps and pure spectra of Raman image constituents (ASA, caffeine, starch and support). b) Distribution maps and pure spectra of MIR image constituents (ASA, caffeine and starch).

The lack of fit was 5.81% for the MCR-ALS analysis of the MIR image and 3.35% for the Raman image. Distribution maps of caffeine, ASA and starch (right side of the figure 3a and 3b) were assigned to the suitable compounds by comparison of Raman and MIR spectral features in pure spectra with literature reference spectra. Distribution maps of both IR and MIR analysis are similar morphologically, although they show some differences in the concentration pattern.

4.2 Image matching of pharmaceutical Raman and MIR images. Classical multitechnique MCR-ALS analysis.

The original Raman and MIR images of pharmaceutical mixtures described in section 2 have the same pixel size; therefore, balancing translation and rotation among images was the only matching step required to have coherent images that allow performing data fusion. As mentioned before, finding comparable information among images collected with different spectroscopic techniques is not trivial. Therefore, the image matching algorithm proposed in section 3.1 has been tested on different types of starting image information, namely global intensity maps, singular value plots obtained from PCA local rank analysis and distribution maps of individual MCR-ALS analysis, to see which option provides the most robust results.

Figure 4 shows the starting image information used for the image matching procedure. Figure 4a shows the global intensity maps of Raman (image to be aligned) and MIR (reference image) images. Each point in the global intensity map is the sum of all Raman and MIR intensities of a particular pixel spectrum. Figure 4b shows the second and the third singular value plots of Raman and MIR images obtained from the local PCA analysis performed in the whole image by moving small windows around each individual pixel area until the entire image has been scanned⁶. Local PCA analysis was chosen instead of global PCA because local analysis is more focused on finding compound overlap rather than global image trends, which could be more dependent on the technique used. Singular values obtained in these local analyses have been displayed together in singular value plots where the spatial structure of the image is preserved (see figure 4b). Second and third singular value plots of Raman and MIR images were the only singular values of the four used in the matching procedure due the highest similarity among them. Figure 4c displays the distribution maps of the three pure constituents (caffeine, ASA and starch) resolved in section 4.1 by individual MCR-ALS analysis of Raman and MIR images. It should be noted that the Raman constituent related to the diamond cell support is not used during the matching procedure because it is not a contribution defined in both MIR and Raman images. Finally, figure 4d shows the

binarized version of the distribution maps shown in figure 4c, i.e, maps codified regarding to the presence (1, white color) and absence (0, black color) of the pure compound. A threshold value is set to mark the limit between significant and negligible pure image constituent.

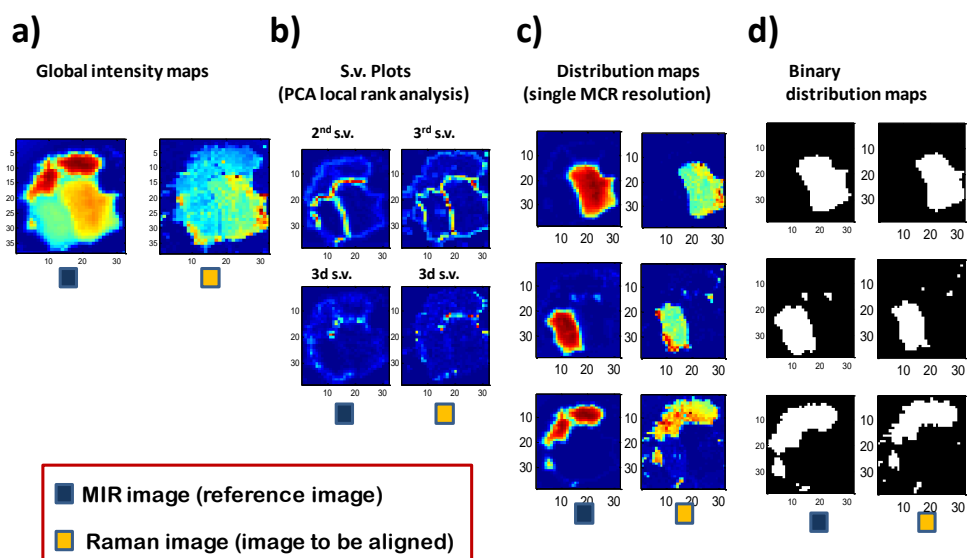


Figure 4. Image starting information for matching procedure of Raman and MIR images. a) Global intensity plots. b) Second and third singular value plots from PCA local rank analysis. c) Distribution maps of ASA, Caffeine and Starch obtained from individual MCR-ALS image analysis. D) Binarized distribution maps of ASA, caffeine and starch.

Different initial estimates of translation and rotation parameters (dx, dy and $d\alpha$) were used to test the robustness of the optimized parameters for the different kinds of starting image information used. Table 1 shows the values of initial translation and rotation parameters and the optimized values for the different kinds of initial image starting information used. Different trends can be seen in the optimized parameters of Table 1. Optimized parameters lack robustness when global intensity maps and singular value plots coming from PCA analysis are used. The reason is that MIR and Raman images show different patterns of signal intensity and this affects directly (figure 4a) or indirectly (figure 4b) the information compared in both images, which is not similar enough for a robust matching among images. The use of distribution maps during the matching procedure presents robustness in the translation parameters found (dx, dy) but still some problems in finding $d\alpha$ due to the slightly different concentration patterns in chemical pixels among maps of different images (see figure 4c). However, the morphology of the distribution maps obtained in both MIR

and Raman images is very similar. Therefore, when the distribution maps are binarized, optimal parameters are robust due to the fact that the pattern in presence/absence of compounds, which is the sole information contained in binarized maps and that merely preserves the map morphology, is very consistent among images (see figure 6d).

Table 1. Optimized translation and rotation parameters for matching of MIR and Raman images using global intensity maps, singular values plots, distributions maps and binarized distribution maps as starting image information.

Starting information	Initial parameters			Optimized parameters		
	α	dx	dy	α	dx	dy
Global intensity maps	4	3	-1	3.65	2.60	-0.65
	10	5	-6	14.03	3.87	-1.29
	8	3	6	8.25	3.14	5.86
S.v. Plot	4	3	-1	6.88	3.29	-1.56
	10	5	-6	17.18	4.00	-1.74
	8	3	6	3.81	4.69	6.11
Distribution maps	4	3	-1	6.72	2.41	-1.35
	10	5	-6	5.96	2.28	-1.40
	8	3	6	13.5	3.05	-1.43
Binary distribution maps	4	3	-1	7.21	2.51	-1.48
	10	5	-6	7.1	2.51	-1.51
	8	3	6	7.1	2.51	-1.51

After the study of the effect of starting image information on the image matching procedure, binarized distribution maps have proven to be the best option to obtain a robust matching among images. The use of binarized distribution maps as starting information for matching images presents several advantages, namely:

- Consistent compound presence/absence and morphology patterns, independent of the spectroscopy used.
- The information of compounds is separated in the resolved maps. This allows selecting only the maps that are comparable among images for proper matching. Note that this advantage is absent in the rest of starting information tested, i.e. global intensity maps or singular value plots, where all compounds (common or specifically detected by a particular technique) contribute to the information compared.

Once optimal translation and rotation parameters are found using the suitable binary distribution maps of Raman and MIR images, they are applied to transform the image to be aligned (Raman image). Spatial transformations applied to the Raman image generate regions with empty pixels. These regions have been removed from both images before data fusion.

Matched MIR and Raman images are joined in a multitechnique multiset structure setting one image next to each other building a row-wise augmented data matrix. MCR-ALS method was carried out in the aligned multitechnique multiset structure using three constituents under the same constraints used in the single MCR-ALS analysis. In this case, support background pixels were removed before the MCR-ALS analysis. For comparison, multiset analysis was also performed on the multitechnique structure formed by Raman and MIR images directly connected before matching was carried out under the same conditions. The lack of fit was 13.7% for the aligned multiset structure, while lack of fit was 24.4% for the misaligned multiset structure. The quality of the MCR-ALS results obtained improves significantly after performing the image matching procedure in the described way. Figure 5 shows MCR-ALS results for the aligned multitechnique multiset.

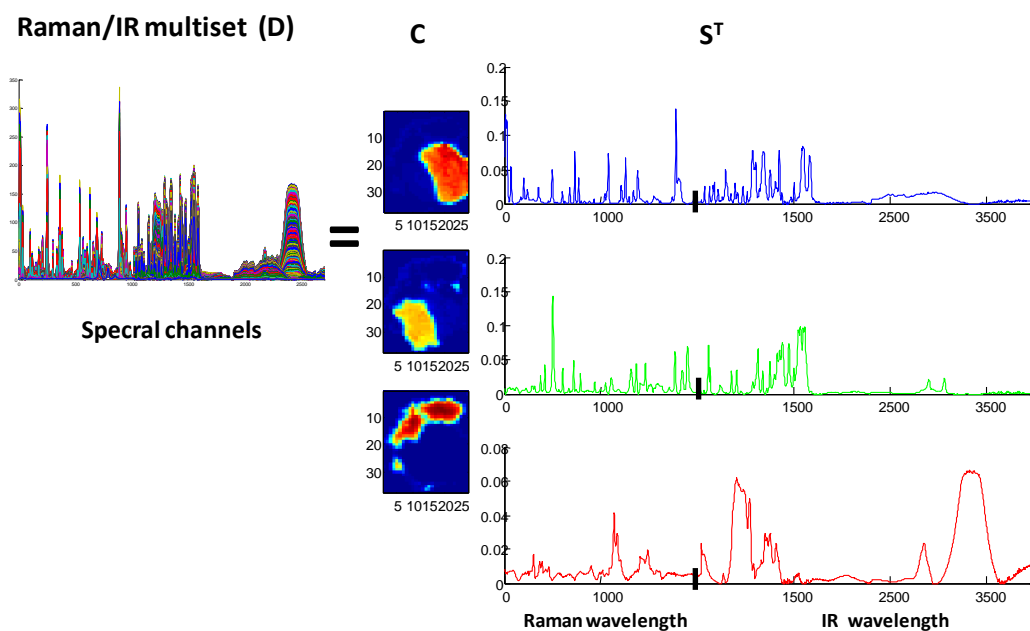


Figure 5. MCR-ALS results of multitechnique image analysis. Resolved distribution maps and pure spectra from MCR-ALS simultaneous analysis of Raman and MIR image on the same area of pharmaceutical mixture.

Pure spectra matrix represents Raman and MIR spectral signatures of each image constituent. Spectral signatures are very similar to reference spectra for these compounds and to those obtained from individual MCR-ALS image analysis of each technique. Recovering correct spectral signatures is a sign of a correct matching preprocessing among Raman and MIR images, since the only set of related distribution maps refers really to the same sample. Misaligned multisets provide less well defined maps and spectral signatures with mixed spectral features of compounds.

4.3 Data fusion of Raman and MIR images with different spatial properties. MCR-ALS analysis of incomplete mutiset structures.

Up to now, multitechnique analysis has been proposed for matched images with the same pixel size. However, pixel size tends to be different among images collected from different spectroscopic platforms, generally due to the different spatial resolution of the hyperspectral imaging technique. To mimic this situation, we used as a case study the combination of MIR and Raman images of the pharmaceutical mixture analyzed before keeping the original resolution for the Raman image and generating different low spatial resolution versions of the MIR image binning in factor of two (2x2) and three (3x3) the original MIR image. Thus we got different low

spatial resolution MIR images where the pixel sizes were $(30 \times 30) \mu\text{m}^2$ and $(45 \times 45) \mu\text{m}^2$ (for two- and three-fold binning, respectively) and a high spatial resolution Raman image with a $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$ pixel size. In this situation, we cannot apply the methodology presented in section 4.2 because pixel sizes are different among MIR and Raman images. To perform image matching, spatial binning of the Raman image with highest resolution (downsampling) was done to obtain the same pixel size as the low spatial resolution MIR image. In this way, both binned Raman and IR images could be matched, as proposed in section 3.1. To exploit the data fusion of images coming from the two techniques and to avoid the drawback of downsampling, i.e., the loss of spatial resolution of the Raman image, an incomplete multiset was formed, as shown in figure 2b) by connecting the row-wise augmented data matrix formed by the matched low resolution Raman and MIR images and the column-wise augmented matrix formed by the highest resolution Raman image appended with its binned version. This is a kind of incomplete multiset where the high spatial resolution MIR image is missing, but instead of using an oversampled version that could include interpolated unreliable information, the variant of MCR-ALS to analyze incomplete multisets, described in section 3.2, has been applied.

For MCR-ALS analysis, the number of compounds resolved was three and the initial estimates were spectra of caffeine, ASA and starch obtained from the SIMPLISMA-based method on the low spatial resolution complete multiset. The analysis was carried out under the constraints of non-negativity in the concentration profiles and pure spectra and with spectra normalization in matrix \mathbf{S}^T . The lack of fit was 10.5% and 8.31% for the incomplete multisets formed using the two- (2x2) and three-fold (3x3) binned MIR image, respectively. Final MCR-ALS results from incomplete multitechnique analysis, i.e, spectral signatures of chemical compounds and highest resolution distribution maps are displayed in figures 6a and 6b for the multisets using the two- (2x2) and three-fold (3x3) binned MIR images, respectively.

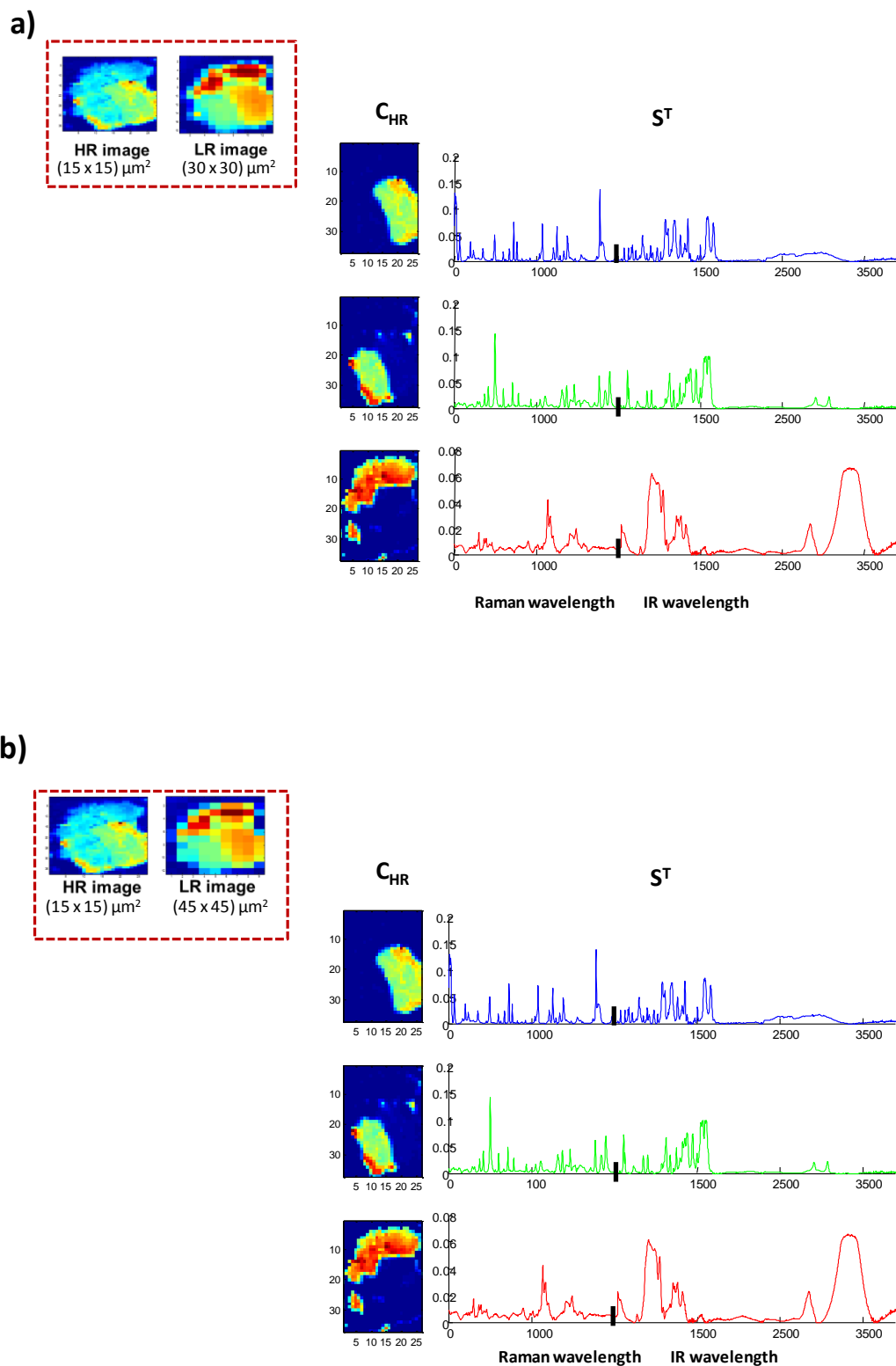


Figure 6. MCR-ALS results of incomplete multiset structures formed by images from different techniques and different spatial resolution. *Left plots:* global intensity maps of Raman and MIR images analyzed together. *Center plots;* highest spatial resolution distribution maps of caffeine, ASA and starch. *Right plots:* related pure Raman and MIR spectral signatures.

The top of figures 6a and 6b displays the global intensity maps of the low spatial resolution MIR and high resolution Raman images analyzed. High spatial distribution maps (C_{HR}) of caffeine, ASA and starch are shown in the center of the plot, while in the right Raman and MIR spectral signatures of the image constituents are shown. As can be seen, C_{HR} and pure spectra recovered for caffeine, ASA and starch are extremely similar for multisets using different binning factors, which confirms the robustness of the results and the suitability of the new version of MCR-ALS for incomplete multisets to treat images with different spatial resolution .

5.CONCLUSIONS

Data fusion of chemical images acquired with different spectroscopic platforms is particularly complex because of the lack of clear analogous information among images, due to the poor morphological structure of this kind of samples and to the variation in signal patterns provided by different spectroscopic techniques.

Coherence among images to be fused allows performing suitable spatial transformations (rotation and/or translation) and coping with differences in spatial resolution. The difficult choice of equivalent pixels in images from different techniques as a basis to perform the spatial transforms is avoided with a new procedure based on a SIMPLEX optimization that use all pixels in the images to be matched. As comparable information among images coming from different spectroscopic platforms, binarized distributions maps obtained from the individual MCR-ALS analysis of each image have been found the best option to obtain a robust alignment and ensure a perfect combination among images. The reason behind is that patterns of presence/absence of compounds in the image are very consistent and are not affected by the technique used in the image acquisition. Another advantage is that the use of binarized distribution maps, where information of each compound is separated from the rest, allows the comparison of maps related only to those compounds that are equally well (or are both) detected by the different spectroscopies.

In the event that images on the same sample present different spatial resolution, balancing pixel sizes is required. A new version of MCR-ALS²⁴ was applied to resolve incomplete multisets built connecting a complete multiset with matched images of the two techniques with the same pixel size, previous downsampling of the image with the highest resolution, with a complete multiset formed by the highest spatial resolution image and its binned version. In doing so, multiset analysis on these incomplete image structures shares the benefit of using the complementary information of all the techniques used and preserves the highest spatial resolution of the best

spectroscopic technique without the need to perform dubious oversampling procedures. The quality of the spectral signatures resolved is significantly better than that from individual image analysis and the spatial distribution of compounds is defined with as best spatial resolution as possible without introducing spurious artifacts related to interpolation.

6. REFERENCES

1. Geladi, P. & Grahn, H. *Multivariate Image Analysis in Chemistry and Related Areas: Chemometric Image Analysis*, John Wiley, Chichester (UK), 1996.
2. Nicolai, B. M., Lötze, E., Peirs, A., Scheerlinck, N. and Theron, K. I. Non-destructive measurement of bitter pit in apple fruit using NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biol. Technol.* **2006**,40, 1–6 ..
3. Piqueras, S., Duponchel, L., Tauler, R. and de Juan, A. Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis. *Anal. Chim. Acta.* **2014** 819, 15–25 .
4. Krafft, C. and Sergo, V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy.* **2006**,20, 195–218 ..
5. Gendrin, C., Roggo, Y. and Collet, C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**,48, 533–53 .
6. De Juan, A., Maeder, M., Hanczewicz, T and Duponchel, L. In Chemometrics Tools for Image Analysis Salzer, R. and Siesler, H. W., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA: 2014, 57-110.
7. N. Tran, T., Wehrens, R. and Buydens, L. M. C. Clustering multispectral images: a tutorial. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**,77, 3–17 .
8. F. Grahn, H. and Geladi, P. *Techniques and Applications of hyperspectral Image analysis*. John Wiley Ltd, 2007.
9. W. T. Krooshof, T., J. Postma, G., J. Melssen, W. and Buydens, M. C. *Evaluation of spectroscopic images, in Biomedical Imaging: Principles and Applications*. John Wiley, Ltd., 2009.
10. Tauler, R., K. Smilde, A. and R. Kowalski, B. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J. Chemom.* **1995**,9, 31–58 .
11. Tauler, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**,30, 133–146 .
12. Jaumot, J., Gargallo, R., de Juan, A. and Tauler, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**,76, 101–110 .
13. Juan, A. de, Rutan, S. C. and Tauler, R. In *Two-way data analysis: Multivariate Curve Resolution: Iterative resolution methods in Comprehensive Chemometrics*. Brown, S., Tauler, R. and Walczak R, Ed., Comprehensive Chemometrics, Elsevier: Oxford, 2009, 473-505.

14. Nascimento, J. M. P. and Dias, J. M. B. Vertex component analysis: a fast algorithm to unmix hyperspectral data. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* **2005**,43, 898–910.
15. Piqueras, S., Duponchel, L., Tauler, R. and de Juan, A. Resolution and segmentation of hyperspectral biomedical images by multivariate curve resolution-alternating least squares. *Anal. Chim. Acta.* **2011**,705, 182–92.
16. Piqueras, S., Burger, J., Tauler, R. and de Juan, A. Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**,117, 169–182.
17. Piqueras, S., Duponchel, L., Offroy, M., Tauler, R. and de Juan, A. Chemometric strategies to unmix information and increase the spatial description of hyperspectral images: a single-cell case study. *Anal. Chem.* **2013**,85, 6303–11.
18. Juan, A., Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M. and Maeder, M. Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**,23, 70–79.
19. De Juan, A. and Tauler, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**,36, 163–176.
20. Brown, L. G. A survey of image registration techniques. *ACM Comput. Surv.* **1992**,24, 325–376.
21. Schowengerdt, R. A. In *Spatial Transforms*. Schowengerdt, R. A., Ed. Remote Sensing: Models and Methods for Image Processing, Elsevier: Oxford, 2006, 229–282
22. Bocklitz, T. W., Crecelius, A. C., Matthäus, C., Tarcea, N., von Eggeling, F., Schmitt M., Schubert U. S. and Popp J. Deeper Understanding of Biological Tissue: Quantitative Correlation of MALDI-TOF and Raman Imaging. **2013**,85,10829-10834.
23. Piqueras, S., Krafft, C., Beleites, C., Egodage, K., von Eggeling, F., Guntinas-Lichius, O., Popp, J., Tauler, R. and de Juan, A. Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues. *Anal. Chim. Acta* (2015). doi:10.1016/j.aca.2015.04.053
24. Alier, M. and Tauler, R. Multivariate Curve Resolution of incomplete data multisets. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2013**, 127, 17–28.
25. Eilers, P. H. C. A Perfect Smoother. *Anal. Chem.* **2003**,75, 3631–3636.
26. Eilers, P. H. C. Parametric time warping. *Anal. Chem.* **2004**,76, 404–11.
27. Schaaff, T. G., McMahon, J. M. and Todd, P. J. Semiautomated Analytical Image Correlation. **2002**,74, 4361–4369.
28. Cruz, J., Bautista, M., Amigo, J. M. and Blanco, M. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. *Talanta.* **2009**,80, 473–8.

29. Duponchel, L., Elmi-Rayaleh, W., Ruckebusch, C. and Huvenne, J. P. Multivariate curve resolution methods in imaging spectroscopy: influence of extraction methods and instrumental perturbations. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**,43, 2057–67
30. Windig, W. and Markel, S. Simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis of FTIR microscopy data. *J. Mol. Struct.* **1993**,292, 161–170.
31. Walczak, B. and Massart, D. L. Dealing with missing data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**,58, 15–27.
32. Walczak, B. & Massart, D. L. Dealing with missing data: Part II. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**,58, 29–42

5.4.1.1 Transformacions espacials per a assolir la congruència espacial d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques

Les imatges adquirides amb diferents plataformes espectroscòpiques no són equivalents (congruents) espacialment degut al reposicionament de la mostra en els diferents instruments quan s'efectua la mesura. Per a solventar aquest problema, existeixen preprocessats que relacionen certs píxels d'una imatge amb els equivalents en una imatge de referència, com és el cas en imatges adquirides amb sensors remots ^{1,2}. En aquest cas, les imatges són captades amb la mateixa tècnica i tenen elements espacials molt ben definits, per exemple, arbres, cases..., que permeten la identificació fàcil de punts de referència per a l'alineament entre elles³. La identificació de punts equivalents entre imatges hiperespectrals químiques procedents de diferents tècniques espectroscòpiques resulta sovint difícil a causa dels diferents patrons d'intensitat de senyal entre les imatges i a la manca d'una estructura espacial clara, cosa que dificulta realitzar les transformacions espacials necessàries per a assolir la congruència.

L'article presentat proposa un procediment per a la fusió d'imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques. El procediment passa per resoldre problemes de preprocessat, com són l'alineament espacial de les imatges, per tal de poder dur a terme l'anàlisi de l'estructura multiconjunt formada per les imatges Raman i MIR d'una mescla de productes farmacèutics (cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó). El pretractament per a aconseguir la congruència entre imatges amb la mateixa mida de píxel consta principalment dels passos il·lustrats en l'esquema de la figura 5.4.1.1.1.

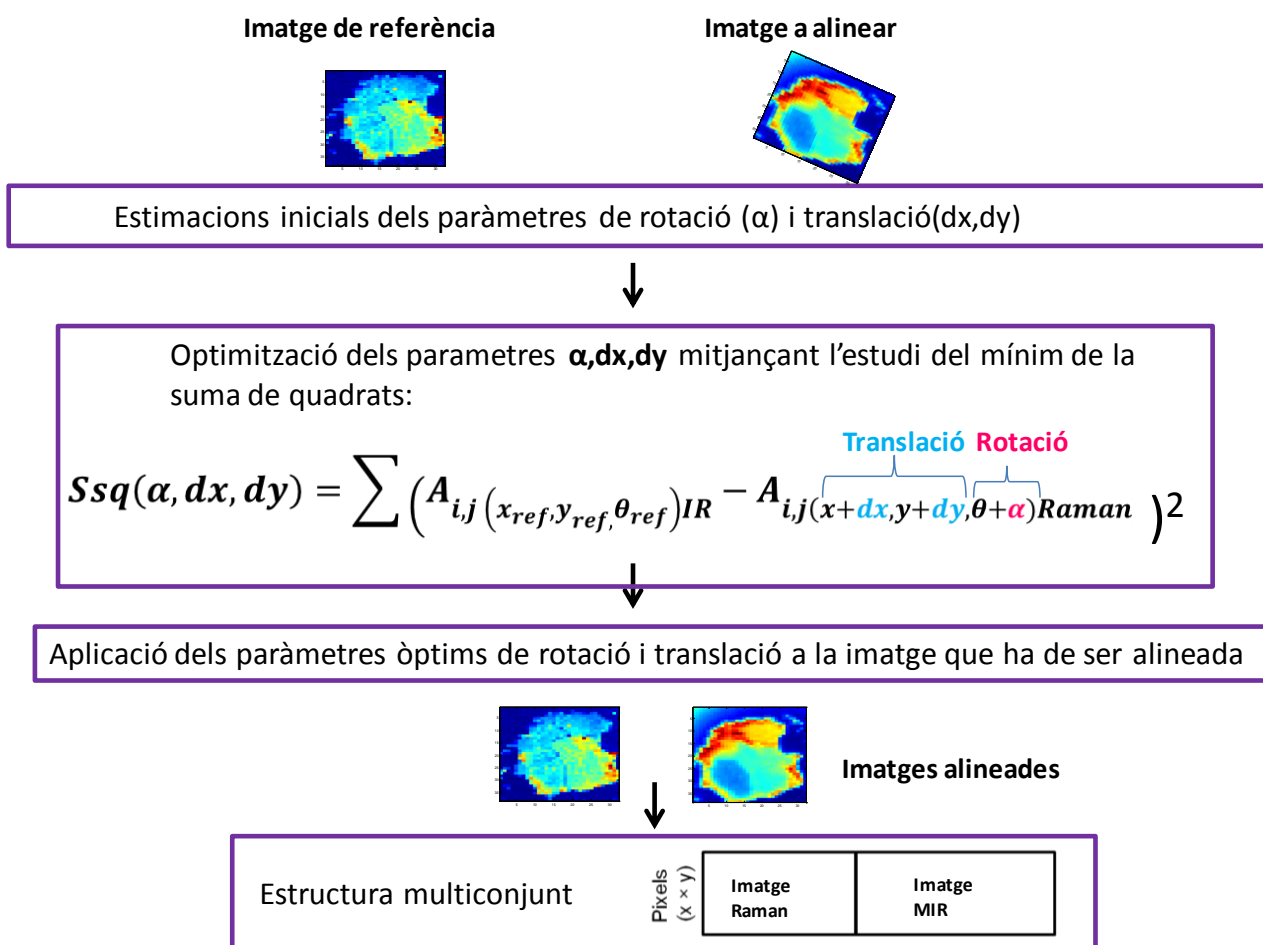


Figura 5.4.1.1.1 Esquema del procediment d'alineament entre imatges hiperespectrals procedents de diferents tècniques espectroscòpiques.

Abans de l'operació d'alineament es calculen les coordenades cartesianes i polars que defineixen tots els píxels de les imatges. Les coordenades polars d'un píxel es defineixen com el radi i l'angle des del centre de la imatge fins a la posició del píxel. A continuació se selecciona la imatge de referència (en aquest cas la imatge MIR) i la imatge que ha de ser alineada (imatge Raman) i s'elaboren les estimacions inicials dels paràmetres de translació i rotació per a assolir la congruència a partir de la comparació visual de les imatges. Aquests paràmetres són optimitzats posteriorment mitjançant un algoritme iteratiu de tipus SIMPLEX que minimitza la suma de quadrats de les diferències entre els valors de la informació dels píxels en la imatge de referència i els de la imatge rotada i traslladada respecte la primera, tal i com es descriu en la següent expressió.

$$Ssq(\alpha, dx, dy) = \sum (A_{i,j}(x_{ref}, y_{ref}, \theta_{ref})_{IR} - A_{i,j}(x+dx, y+dy, \theta+\alpha)_{Raman})^2$$

Equació 5.9

on A és qualsevol mesura associada a un píxel (intensitat de senyal, concentració...), i i i j son els índexs de tots els píxels en les direccions x y y de la imatge, respectivament. Cal comentar que, en realitzar-se l'optimització itertiva dels paràmetres de rotació i translació entre imatges, alguns píxels deixen de tenir un píxel equivalent en l'altra imatge. Aquests píxels 'desaparellats' no s'utilitzen en el càlcul de l'expressió definida per l'equació 5.9. També cal afegir que quan la comparació es realitza amb més d'una parella de representacions de la imatge (per exemple, diversos mapes de distribució), l'equació 5.9 té com a resultat la suma acumulada de la comparació de totes les parelles de representacions complementàries de la imatge i s'optimitza un únic conjunt de paràmetres de rotació i translació.

Aquest tipus de mètode presenta l'avantatge general de que tots els píxels de les imatges s'utilitzen en el procediment d'alineament i no cal triar píxels de referència equivalents entre imatges. L'ús de tots els píxels de les imatges durant el procés d'alineament concedeix robustesa i fiabilitat al mètode i evita cometre errors sistemàtics relacionats amb la selecció errònia de píxels equivalents entre imatges.

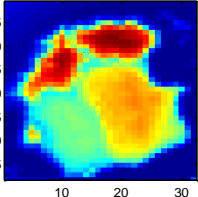
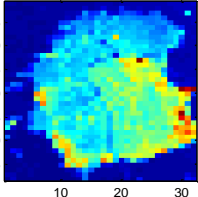
En aquest treball també s'ha investigat quina és la informació inicial de les imatges que cal utilitzar per a obtenir resultats òptims en el procés d'alineament. Així doncs, el procediment s'ha dut a terme prenent com a informació de partida els mapes d'intensitat global, els valors singulars procedents de l'anàlisi de PCA de rang local, els mapes de distribució procedents de l'anàlisi individual MCR-ALS per a cadascuna de les imatges (MIR i Raman) i els mateixos mapes de distribució binaritzats, és a dir, codificats amb 1 i 0 segons la presència/absència del constituent en els píxels de la imatge.

A la taula 5.4.1.1.1 es mostren els paràmetres de rotació i translació obtinguts a partir de la comparació dels mapes d'intensitat global de les imatges Raman i MIR. Aquest tipus d'informació no és una bona elecció com a punt de partida per al procediment d'alineament d'imatges, ja que proporciona resultats poc robustos respecte les diferents estimacions inicials.

Això es degut a les diferències en el patró d'intensitat del senyal global entre els mapes Raman i MIR de la mescla de productes farmacèutics associades a l'ús de diferents tècniques espectroscòpiques.

Taula 5.4.1.1.1 Resultats dels paràmetres òptims de translació i de rotació obtinguts a partir dels mapes d'intensitat global MIR i Raman de la mescla de productes farmacèutics. A sota, mapes d'intensitat global MIR (esquerra) i Raman (dreta).

Informació de partida	Paràmetres inicials			Paràmetres òptims		
	α	dx	dy	α	dx	dy
Mapes d'intensitat global	4	3	-1	3.65	2.60	-0.65
	10	5	-6	14.03	3.87	-1.29
	8	3	6	8.25	3.14	5.86

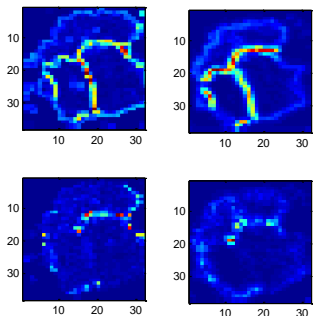



El procediment d'alineament també es va duu a terme a partir dels valors singulars procedents de l'anàlisi de PCA de rang local realitzat amb l'algoritme FSIW-EFA (vegeu secció 4.3.2). Els mapes de valors singulars són el resultat global de les diferents anàlisis locals de PCA realitzades en tota la superfície de la imatge analitzada. Concretament, en l'estudi de la fusió de les imatges Raman i MIR de la mescla de productes farmacèutics, l'anàlisi s'ha executat amb una finestra mòbil de mida de 2x2, ja que es tenia coneixement previ de la presència de tres constituents en la mescla. Durant el procediment tan sols es van emprar els mapes del 2n i 3er de valors singulars, que eren els que mostraven patrons de variació més comparables. Els mapes del primer valor singular es van descartar perquè eren similars als mapes d'intensitat global i reflectien fonamentalment diferències de senyal global entre imatges. La taula 5.4.1.1.2 mostra els resultats de l'alineament. Els paràmetres optimitzats també varien segons les estimacions inicials, de manera anàloga al que succeïa amb l'ús dels mapes d'intensitat global. Els patrons

d'intensitat del senyal són diferents entre les imatges Raman i MIR de la mateixa mostra analitzada i aquest fet també es reflecteix, tot i que en menor mesura, als gràfics dels valors singulars superiors al primer.

Taula 5.4.1.1.2 Resultats dels paràmetres òptims de translació i de rotació obtinguts a partir dels mapes MIR i Raman del segon i tercer valor singular MIR i Raman de la mescla de productes farmacèutics. A sota, mapes del 2n i 3er valor singular procedent de l'anàlisi de rang local per FSIW-EFA de MIR (esquerra) i Raman (dreta).

Informació de partida	Paràmetres inicials			Paràmetres òptims		
	α	dx	dy	α	dx	dy
Mapes de valors singulars	4	3	-1	6.88	3.29	-1.56
	10	5	-6	17.18	4.00	-1.74
	8	3	6	3.81	4.69	6.11

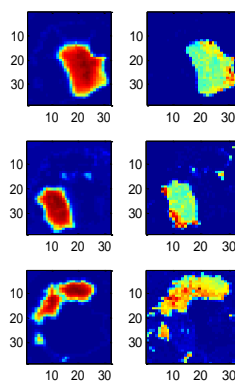


Els mapes de distribució de la cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó procedents de l'anàlisi MCR-ALS individual de les imatges Raman i MIR de la mescla de productes farmacèutics també van ser assajats com a informació de partida per al procediment d'alineament (vegeu taula 5.4.1.1.3) on apareixen els mapes de distribució de la imatge MIR i Raman). Es van determinar tres constituents per a la imatge MIR i quatre per a la imatge Raman, per causa del suport emprat durant la mesura (cel·la de diamant) que implicava una contribució del senyal en l'anàlisi de la imatge Raman. L'anàlisi MCR-ALS es va dur a terme sota les restriccions de no-negativitat en els perfils de concentració i espectres purs i la normalització de la matriu \mathbf{S}^T per ambdues imatges.

En el procediment d'alineament entre els mapes de distribució s'han seleccionat els mapes de la cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó per a ambdues imatges, que són els components comuns en la resolució MCR-ALS de les imatges Raman i MIR. Aquest és un avantatge propi de l'ús dels mapes de distribució procedents de MCR, ja que la informació dels constituents es troba separada en perfils i només aquells que corresponen a components detectats per ambdues tècniques s'usen per a l'alineament. Els mapes d'intensitat global o els valors singulars de PCA, que combina informació de molts components, no ofereixen aquest avantatge. La taula 5.4.1.1.3 mostra els resultats obtinguts del procediment d'alineament emprant els mapes de distribució MIR i Raman com a informació de partida. Els paràmetres de translació i rotació són consistents durant el procediment d'alineament, però el paràmetre de rotació varia lleugerament ateses les petites diferències d'intensitat entre les concentracions dels píxels de cadascun dels constituents entre els mapes de distribució Raman i MIR.

Taula 5.4.1.1.3 Resultats dels paràmetres òptims de translació i de rotació obtinguts a partir dels mapes de distribució procedents de l'anàlisi individual de la imatge MIR i Raman de la mescla de productes farmacèutics. A sota, mapes de distribució per a la imatge MIR (esquerra) i Raman (dreta).

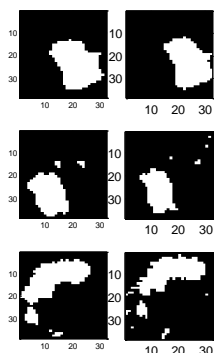
Informació de partida	Paràmetres inicials			Paràmetres òptims		
	α	dx	dy	α	dx	dy
Mapes de distribució	4	3	-1	6.72	2.41	-1.35
	10	5	-6	5.96	2.28	-1.40
	8	3	6	13.5	3.05	-1.43



Per tal de millorar els resultats d'alineament, els mapes de distribució procedents de MCR van ser binaritzats; és a dir, codificats amb uns i zeros que definien la presència o absència de cadascun dels constituents purs de la mescla de productes farmacèutics, respectivament. D'aquesta manera s'aconsegueixen patrons d'intensitat molt similars entre les imatges Raman i MIR, ja que les zones d'existència de cada component es detecten de manera comparable amb les dues tècniques espectroscòpiques. La taula 5.4.1.1.4 mostra els resultats obtinguts del procediment d'alineament a partir dels mapes de distribució binaritzats. Els paràmetres optimitzats de translació i rotació són robustos i consistents, independentment dels valors usats com a estimacions inicials. Així doncs, els mapes de distribució binaritzats són la millor opció per a l'estudi d'optimització dels paràmetres de translació i rotació entre imatges, ja que aquests mapes presenten una morfologia molt similar entre ells que no es veu afectada per variacions de senyal associades a les tècniques espectroscòpiques usades per a la seva obtenció.

Taula 5.4.1.1.4 Resultats dels paràmetres òptims de translació i de rotació obtinguts a partir dels mapes de distribució binaritzats procedents de l'anàlisi individual de la imatge MIR i Raman de la mescla de productes farmacèutics. A sota, mapes de distribució binaritzats per a la imatge MIR (esquerra) i Raman (dreta).

Informació de partida	Paràmetres inicials			Paràmetres òptims		
	α	dx	dy	α	dx	dy
Mapes de distribució binaritzats	4	3	-1	7.21	2.51	-1.48
	10	5	-6	7.1	2.51	-1.51
	8	3	6	7.1	2.51	-1.51



Un cop optimitzats els paràmetres de translació i rotació, s'apliquen per a transformar la imatge Raman (imatge a alinear). Les imatges MIR i Raman congruents ja poden ser fusionades per a formar una matriu augmentada en la direcció de les files. L'estructura multiconjunt és analitzada mitjançant el mètode MCR-ALS, que proporciona una única matriu \mathbf{C} , comú per a les imatges analitzades i una matriu \mathbf{S}^T , formada per tantes submatrius com tècniques acoblades (vegeu figura 4.4.2.1 de la secció d'anàlisi multiconjunt). L'anàlisi de resolució conjunta va proporcionar els mapes de distribució de la cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó, comuns per a les imatges Raman i MIR, i una matriu d'espectres purs caracteritzats per les signatures espectrals Raman i MIR dels productes de la mescla farmacèutica (vegeu figura 5.4.1.1.2). La millora en resolució associada al procés d'alineament es pot comprovar comparant la manca d'ajust del model entre l'anàlisi conjunta d'imatges alineades (13,7%) i no alineades (24,4%) i també a través de la millora en la definició dels mapes de distribució i en les signatures espectrals resoltes. Els mapes de distribució obtinguts en l'anàlisi són molt similars als mapes de distribució obtinguts en l'anàlisi individual per a cadascuna de les imatges (vegeu figura 3a i 3b de l'article 5.4-I), fet que confirma l'alineament correcte entre les imatges.

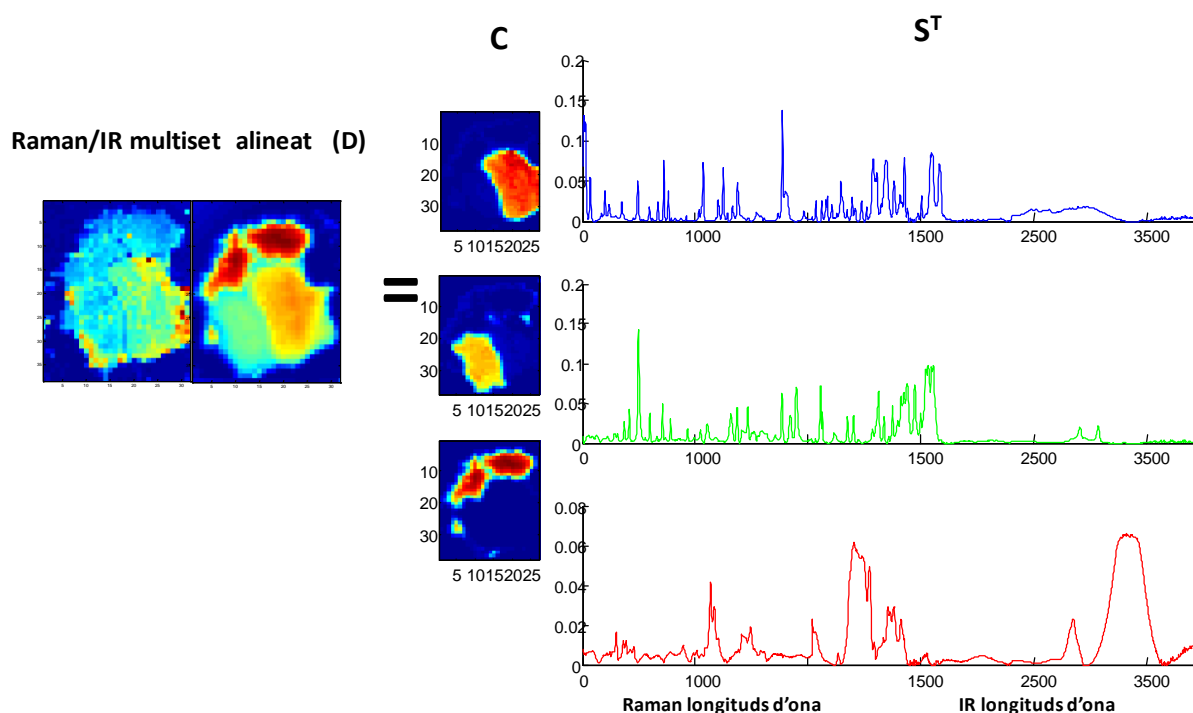


Figura 5.4.1.1.2 Resultats de l'anàlisi conjunta MCR-ALS de les imatges congruents MIR i Raman de la mescla de productes farmacèutics. Mapes de distribució (matriu **C**) i espectres purs (**S^T**) de la cafeïna, àcid acetilsalicílic i midó.

5.4.1.2. Acoblament d'imatges amb diferent resolució espacial procedents de diferents tècniques espectroscòpiques

Les imatges experimentals Raman i MIR de la mescla de productes farmacèutics estudiada en la secció 5.4.1.1 presentaven la mateixa mida de píxel ($15 \times 15 \mu\text{m}^2$). Per aquesta raó no ha estat necessari compensar diferències de resolució espacial. Tot i així, en aquest treball s'han simulat diferències en les mides de píxel entre les imatges Raman i MIR, ja que és un dels problemes més comuns a l'hora d'acoblar imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques.

La imatge original MIR va ser sotmesa a *binning* espacial amb un factor de 3 (3×3) i de 2 (2×2) en la direcció de les coordenades x/y dels píxels. D'aquesta manera es va disposar d'imatges MIR de baixa resolució espacial (mida de píxel de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ i $45 \times 45 \mu\text{m}^2$) i d'una imatge Raman d'alta

baixa resolució espacial (mida de píxel de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ i $45 \times 45 \mu\text{m}^2$) i d'una imatge Raman d'alta resolució espacial (mida de píxel $15 \times 15 \mu\text{m}^2$). Així es genera un nou cas d'estudi, on l'objectiu principal serà gaudir dels avantatges de la informació complementària proporcionada per ambdues tècniques i assolir la màxima resolució espacial possible.

L'estratègia utilitzada per a la compensació de la mida de píxel entre imatges procedents de diferents tècniques espectroscòpiques fa ús d'una nova variant del mètode MCR-ALS per a l'anàlisi d'estructures multiconjunt incompletes ⁴.

El primer pas consisteix en la formació d'una estructura multiconjunt incompleta formada per imatges de baixa resolució Raman i MIR degudament acoblades, tal com s'ha explicat en la secció 5.4.1.1, i la imatge Raman d'alta resolució espacial (vegeu figura 5.4.2.1.1). Per a la formació de l'estructura de dades incompleta es necessita una versió de baixa resolució espacial de la imatge Raman original. Aquesta imatge Raman de baixa resolució és creada fent *binning* espacial sobre els píxels, fins que s'assoleix la mateixa resolució de la imatge MIR. Quan les imatges MIR i Raman presenten la mateixa mida de píxel, de baixa resolució, poden ser alineades a partir de l'ús dels mapes de distribució binaritzats de components comuns procedents de l'anàlisi individual MCR-ALS. Les imatges alineades són acoblades formant una matriu augmentada en la direcció de les files. D'aquesta forma, s'aconsegueix una estructura multiconjunt incompleta formada per dues estructures multiconjunt regulars, \mathbf{D}_A i \mathbf{D}_B . \mathbf{D}_A és una matriu augmentada en la direcció de les files, formada per les imatges alineades de baixa resolució Raman i MIR, i \mathbf{D}_B és una matriu augmentada en la direcció de les columnes, formada per les imatges Raman de baixa i alta resolució espacial. Les dues estructures regulars \mathbf{D}_A i \mathbf{D}_B segueixen els models bilineals descrits en les equacions 5.10 i 5.11.

$$\mathbf{D}_A = \mathbf{C}_{LR} [\mathbf{S}_{Raman}^T; \mathbf{S}_{IR}^T] \quad \text{Equació 5.10}$$

$$\mathbf{D}_B = [\mathbf{C}_{LR}; \mathbf{C}_{HR}] \mathbf{S}_{Raman}^T \quad \text{Equació 5.11}$$

L'estructura \mathbf{D}_A proporciona una matriu \mathbf{C}_{LR} , que defineix els mapes de distribució de les imatges Raman i MIR de baixa resolució, i la matriu \mathbf{S}^T , que conté les signatures espectrals dels components purs associats a l'espectroscòpia Raman i MIR. En canvi, el model bilineal de l'estructura \mathbf{D}_B proporciona la matriu \mathbf{C} , que defineix els mapes de distribució d'alta i baixa resolució espacial (\mathbf{C}_{LR} i \mathbf{C}_{HR}) comuns per a les imatges Raman i MIR, i una matriu \mathbf{S}_{RAMAN}^T , que descriu els espectres purs Raman dels constituents de la imatge.

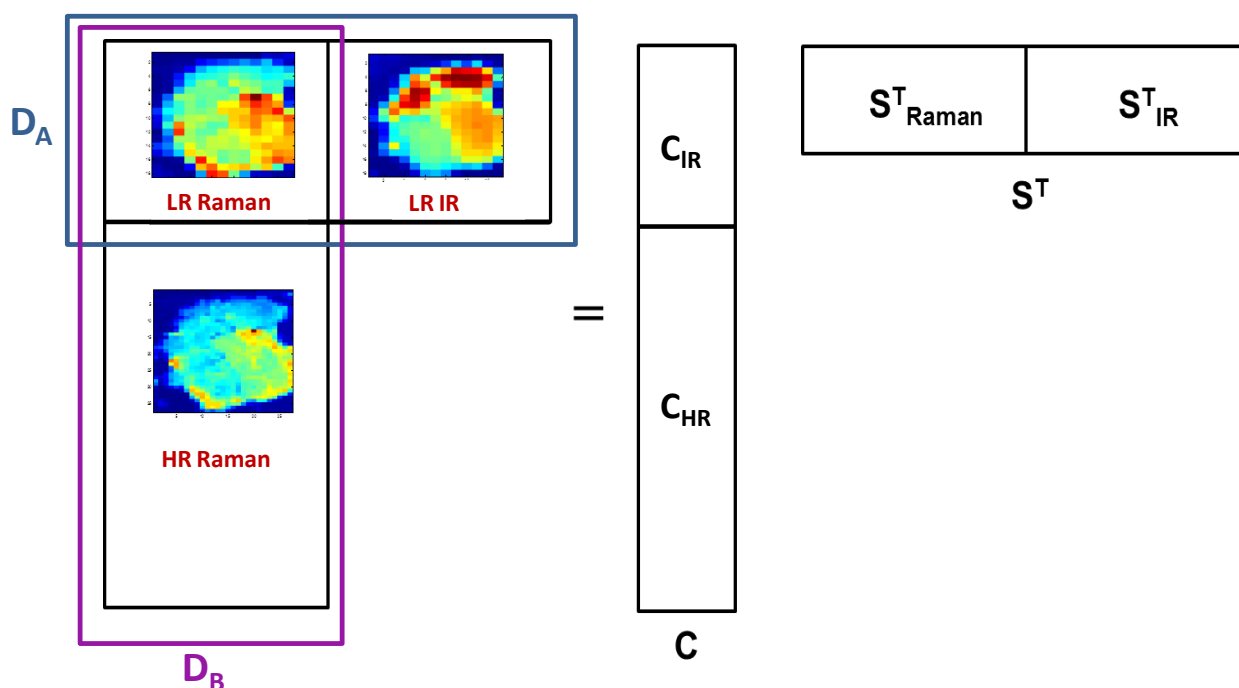


Figura 5.4.2.1.1. Representació gràfica de l'estructura multiconjunt incompleta formada per imatges MIR i Raman de diferent resolució espacial. \mathbf{D}_A : Estructura multiconjunt regular formada per les imatges Raman i MIR de baixa resolució espacial (LR). \mathbf{D}_B : Estructura multiconjunt regular formada per la versió de la imatge Raman de baixa resolució (LR) i alta resolució espacial (HR). Matriu \mathbf{C} formada pels mapes d'alta i baixa resolució espacial (\mathbf{C}_{HR} i \mathbf{C}_{LR}) de la mostra i matriu \mathbf{S}^T formada pels espectres purs Raman i MIR.

L'estructura multiconjunt irregular és analitzada mitjançant la nova versió MCR-ALS per a conjunts de dades incompletes. Aquesta nova versió optimitza conjuntament les dues estructures multiconjunt regulars (\mathbf{D}_A i \mathbf{D}_B) mitjançant la minimització de la suma dels quadrats entre el

producte dels perfils de concentració i els espectres purs calculats i les dades originals per a cadascuna de les estructures, tal i com es mostra en l'equació 5.12.

$$\min(\text{ssq}(\mathbf{D}_A - \mathbf{C}_{\text{LR}} [\mathbf{S}_{\text{Raman}}^T, \mathbf{S}_{\text{IR}}^T]) + \text{ssq}(\mathbf{D}_B - [\mathbf{C}_{\text{LR}}, \mathbf{C}_{\text{HR}}] \mathbf{S}_{\text{Raman}}^T)) \quad \text{Equació 5.12}$$

Finalment, s'acaba escollint la matriu d'espectres purs, \mathbf{S}^T , procedent de la resolució \mathbf{D}_A , i els mapes de distribució d'alta resolució espacial, \mathbf{C}_{HR} procedents de la resolució \mathbf{D}_B , com a resultats finals de la resolució de l'estructura incompleta, ja que en la matriu \mathbf{S}^T és on es troben descrits els senyals espectrals per a cadascuna de les tècniques acoblades i la matriu \mathbf{C}_{HR} permet recuperar els mapes d'alta definició espacial comuns a les dues tècniques sense la necessitat de perdre resolució espacial.

Tot i fer la tria de \mathbf{S}^T i \mathbf{C}_{HR} a partir de la resolució de \mathbf{D}_A i \mathbf{D}_B , respectivament, és important recordar que els resultats de les resolucions de \mathbf{D}_A i \mathbf{D}_B es combinen contínuament en cada cicle iteratiu de la resolució de l'estructura multiconjunt i són necessaris per a l'obtenció de la matriu \mathbf{S}^T i la matriu \mathbf{C}_{HR} que descriuen el sistema de manera completa. Les mateixes restriccions emprades durant l'anàlisi conjunta d'estructures regulars poden ser emprades durant l'anàlisi de les estructures incompletes.

L'anàlisi MCR-ALS de les imatges MIR i Raman amb diferent resolució espacial acoblades ens ha permès descriure de forma completa el sistema sense la necessitat de perdre resolució espacial. Els mapes d'elevada resolució espacial descriuen els components de la mescla farmacèutica detalladament i els espectres purs Raman i MIR presenten signatures espectrals millor definides en comparació amb els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi individual de cadascuna de les imatges (vegeu figures 3a i 3b de l'article 5.4-I).

El fet de disminuir més o menys la mida de píxel de les imatges MIR (en factors de *binning* de 2 o 3) no ha afectat als resultats, ja que l'anàlisi conjunta amb la imatge d'alta resolució Raman manté la màxima resolució espacial. En la figura 6a i 6b de l'article 5.4-I es mostren els resultats finals (matriu \mathbf{S}^T i matriu \mathbf{C}_{HR}) per a l'estructura multiconjunt incompleta formada per les imatges

de baixa resolució Raman i MIR (mida de píxel 30×30 i $45 \times 45 \mu\text{m}^2$) i la imatge Raman d'alta resolució (mida de píxels $15 \times 15 \mu\text{m}^2$) sota les restriccions de no negativitat en ambdós perfils i la normalització dels espectres purs. A l'esquerra de la figura 6a i 6b s'han ajuntat els mapes d'intensitat global de les imatges MIR, amb mides de píxel de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ o $45 \times 45 \mu\text{m}^2$ i la imatge original Raman amb una mida de píxel de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$, on es verifica que la diferent mida de píxel de les imatges de baixa resolució no afecta als resultats finals, ja que els senyals espectrals i els mapes d'alta resolució espacial d'ambdues tècniques acoblades són recuperats correctament. La bona recuperació dels mapes d'alta resolució mitjançant la nova versió del mètode MCR-ALS per a estructures incompletes confirma el potencial del mètode, que permet treballar amb imatges complementàries procedents de diferents tècniques sense necessitat d'adquirir les mesures en les mateixos temps, preservant la difinició de la mostra proporcionada per la tècnica de major resolució espacial.

5.4.2 Bibliografia

- (1) Brown, L. G. (1992) A survey of image registration techniques. *ACM Comput. Surv.* 24, 325–376.
- (2) Schowengerdt, R. A. (2006) Spatial transforms, in *Remote Sensing: Models and Methods for Image Processing* (Schowengerdt, R. A., Ed.) 3th ed., pp 229–282.
- (3) Bocklitz, T. W., Crecelius, A. C., Tarcea, N., Schmitt, M., Schubert, U. S., and Popp, J. (2013) Deeper Understanding of Biological Tissue: Quantitative Correlation of MALDI-TOF and Raman Imaging. *Anal. Chem.* 85, 10829–10834.
- (4) Alier, M., and Tauler, R. (2013) Multivariate Curve Resolution of incomplete data multisets. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 127, 17–28.

CAPÍTOL 6:

Conclusions

1. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares, MCR-ALS, has been proven to be an efficient method for hyperspectral image resolution that recovers the underlying spectroscopic bilinear model of the spectroscopic measurement, i.e., concentration profiles (folded back into distribution maps) and pure spectra of the image constituents, from the sole use of the raw image measurement. This algorithm is flexible and adapts particularly well to image resolution due to the ease of introduction of external spectral and spatial information about the image and to the ability to work with single and multiset image arrangements.
2. Preprocessing methods have been selected so that natural properties of the spectroscopic signals, e.g., non-negativity, could be preserved. On the one hand, Multiplicative Scatter Correction (MSC) has been proposed to remove scattering-related artefacts from NIR image spectra. On the other hand, Asymmetric Least Squares (AsLS) has been used for the first time to remove baseline contributions of Raman and FTIR image spectra. AsLS algorithm corrects baselines as long as they are smoother and with a significantly lower frequency than the useful signal, as it is the case with the fluorescent contributions and Mie scattering when compared with the related Raman and IR spectral features, respectively.
3. MCR-ALS results can be used to identify image constituents, detect similar image regions (segmentation) or recover quantitative intrainage information. These tasks are viable due the following advantages linked to properties of resolved concentration profiles and pure spectra:
 - a. They are excellent low dimension, noise-filtered meaningful basis of the pixel space and the spectral space of the image.
 - b. They are chemically meaningful and, hence, easy to interpret.
 - c. The information of each constituent is contained in separate profiles.
4. The use of concentration profiles (MCR scores) provides a small representation of the pixel space, speeding up segmentation tasks as compared to using raw spectra. The meaningfulness of MCR scores helps also in the interpretation of the centroid properties, defined as abundances of the image constituents in each segmented class. Because the

information of each image constituent (chemical or not) is separate in distinct profile, a flexible selection of the profiles to be input in the segmentation scheme, ignoring background contributions, can be performed. Segmentation schemes can also be built taking into account the pixel similarities in terms of absolute abundance of image constituents (raw concentration profiles) or enhancing the role of minor constituents in the segmentation by autoscaling profiles and working with similarities of constituent abundance in relative terms.

5. MCR-ALS allows single image and image multiset analyses. Image multiset analysis describes the chemical system comprehensively due the complementary information of the different images analyzed simultaneously and provides results with higher quality and less ambiguity in the final resolution results.
6. MCR-ALS multiset analysis has been successfully applied to treat sets of related images acquired with the same spectroscopic technique and to provide input information for quantification purposes. Quantitative analysis (both at a global and at a pixel level) starts by the resolution of an image multiset structure followed by the use of the mean values of distribution maps to build pseudounivariate calibration models for each image constituent for global or local quantification. The calibration models built using NIR images gave satisfactory figures of merit associated with the quantitative results. Different variants of validation for the quantitative analysis, testing different combinations in the steps of resolution and construction of the pseudounivariate calibration lines, provided equivalent results. A relevant result was that prediction of new independent images can be carried out without updating the resolution analysis, performed only once in a representative image calibration set. Instead, a single least-squares step performed using the pure spectra recovered from the resolution of the images in the calibration set and the raw spectra of the new image is sufficient to recover the concentration profiles for the new image and the related quantitative information. This procedure results in a decrease of computation time and the quality of the quantitative information is retained. Quantitative analysis at a pixel level has allowed the study of the constitutional and distributional aspects of heterogeneity and has shown that both aspects are needed for a good characterization of the samples.

7. MCR-ALS multiset analysis on images acquired during process monitoring provides a complete description of the process from a global, local and structural point of view. Process monitoring by images and multiset MCR-ALS analysis provides process profiles at a global (image) and local (pixel) level and is very powerful in discriminating process compounds with similar process evolution behavior, since they can be distinguished by variations in their spatial distribution pattern. It has been also proven that process evolution monitored by hyperspectral images can be equally well described if images are acquired on the same or on different areas of the sample surface during the process, as long as the material of the area scanned is sufficiently representative.
8. The combination of low spatial resolution complementary distribution maps coming from MCR-ALS image multiset analysis with super-resolution algorithms opens up a way to increase the spatial resolution of hyperspectral images, overcoming instrumental limitations of the experimental setup used. A set of properly designed complementary images, always shifted from each other with a motion step equal to the pixel size desired, combined with suitable chemometric tools (MCR-ALS image multiset analysis and super-resolution post-processing) is the strategy proposed to increase spatial resolution of hyperspectral images. The use of the low spatial resolution distribution maps obtained from multiset MCR-ALS analysis of complementary images as starting information for the super-resolution post-processing decreases computation time as compared to working with the raw images and provides super-resolved noise-filtered maps, with high spatial resolution and constituent-specific information.
9. The combination of multiset resolution and segmentation analysis allows a good differentiation of the characteristics associated with populations of biological tissue samples in different pathological conditions. Images from the different populations are always analyzed in separate multisets to obtain better and more conclusive results. For each population multiset, the data analysis workflow includes a multiset resolution analysis on the complete images, a multiset segmentation on the MCR scores obtained and a final multiset resolution on the pixels related to segmentation classes of interest for diagnostic. Thus, multiset resolution analysis on the complete images identifies the

spectral signatures and the spatial distribution of the most salient biological components. Multiset segmentation analysis on MCR scores provides classes common to all samples (images) in a population, interesting for diagnostic because they show general population trends, and specific classes, related to one or few samples, which reflect the natural biological variability of the analyzed samples. Finally, local MCR-ALS multiset on segmentation classes of interest for diagnostic provides more detail on the description of the tissue related to the class selected. In this last step, differences in the resolved spectral signatures for analogous classes in the two sample populations studied provide spectral biological markers useful for an objective clinical diagnostic.

10. Data fusion of images collected with different spectroscopic platforms benefits from complementary spectral information and improves the description of chemical systems. The simultaneous analysis of images collected by different spectroscopic platforms requires a prior preprocessing to ensure spatial congruence among images. A SIMPLEX-based procedure that optimizes rotation/translation parameters among images and compares all pixels of the binarized distribution maps coming from the individual resolution analysis of each image has been proposed to achieve this goal. Resolved binarized maps, representing only presence/absence of image constituents, are ideal for image matching, since this kind of information is consistent in the different spectroscopic techniques and is unaffected by different patterns in spectroscopic signal intensities. Besides, the fact of using resolved information allows selecting only the constituents detected by all techniques for image matching. As an advantage over classical approaches, all pixels are used during image matching procedure, thus avoiding difficulties linked to the selection of equivalent reference pixels among images.
11. After ensuring spatial congruence of images from different platforms, MCR-ALS is proven to be a well adapted method for multitechnique image analysis. In this context and for the analysis of a single sample by several imaging techniques, MCR-ALS provides an augmented matrix of pure spectra (\mathbf{S}^T), related to the pure spectral signatures of each of the coupled techniques, and a single concentration matrix (\mathbf{C}), from which the distribution maps for the constituents in the sample are derived.

12. When working with images acquired with different spectroscopic platforms and different spatial resolution, a new variant of MCR-ALS for incomplete multiset structures allows taking advantage of the complementary information of the spectroscopic techniques without losing spatial resolution. The incomplete multiset structure is formed by two regular multisets with shared information: a) a multitechnique multiset formed by equal low spatial resolution congruent images and b) a multiset formed by the image coming from the technique with the highest spatial resolution and its binned low spatial resolution version. Both regular multisets are optimized within each iterative cycle in MCR-ALS and a single error function is minimized. When convergence is achieved, a set of distribution maps with the highest possible spatial resolution and pure spectral signatures related to each of the coupled spectroscopic techniques are obtained.
13. From the different studies carried out during this thesis, the following protocols for the analysis of hyperspectral images have been designed: a) a protocol for individual image analysis, where resolution, identification of the image constituents and detection of image regions with similar properties are the main goals; b) a protocol for the simultaneous analysis of several images acquired with the same spectroscopic technique, where multiset resolution analysis provides resolved distribution maps that can be afterwards used to study the heterogeneity of the samples, to obtain quantitative information, to increase spatial resolution of the original hyperspectral images and to describe a process evolution; c) a protocol combining multiset resolution and segmentation for the identification of different biological tissues and differentiation among populations of biological samples with different pathological conditions and d) a protocol for data fusion of images coming from different spectroscopic platforms, which includes a matching preprocessing to ensure spatial congruence among images and a second step of multitechnique MCR-ALS analysis, using the variant for incomplete multiset structures, when differences of spatial resolution among images exist. The protocols proposed were based on the examples presented in this thesis, but can be generalized for analogous problems.

